



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS
DE EXTRACTOS DE MICROALGAS CON RESPUESTA
ANTILEISHMANIA, ANTIOXIDANTE, ANTIFÚNGICO,
CITOTOXICIDAD Y ANTIBACTERIANO

AUTORAS

Ye shi Chung Hong
Gabriela Alejandra Hidalgo Caluquí

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN DE COMPONENTES BIOACTIVOS DE EXTRACTOS DE
MICROALGAS CON RESPUESTA ANTILEISHMANIA, ANTIOXIDANTE,
ANTIFÚNGICO, CITOTOXICIDAD Y ANTIBACTERIANO

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos para
establecidos para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía

Msc. María Alejandra Cruz Salazar

Autoras:

Ye shi Chung Hong

Gabriela Alejandra Hidalgo Caluquí

Año

2017

DECLARACIÓN PROFESOR-GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Alejandra Cruz Salazar
Máster en Ingeniería de Procesos y Biotecnología
C.C.1719928572

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

Mayra Fernanda Chico Terán
Máster en Biotecnología
1003327044

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen a los derechos de auto vigentes”

Ye Shi Chung Hong
C.C.1718884859

Gabriela Alejandra Hidalgo Caluquí
C.C.1104363468

AGRADECIMIENTO

A la Corporación para la Investigación Energética, al Laboratorio de Biotecnología Energética, a M. Sc. María Cristina Guamán y M. Sc. Nory González por los conocimientos impartidos durante la realización de nuestra tesis.

Al Centro de Investigación Traslacional de la Universidad de las Américas y a sus investigadores por su ayuda y apoyo durante la realización de nuestra tesis

DEDICATORIA

A nuestras familias por apoyarnos en este largo camino estudiantil, por siempre estar presentes y brindarnos su amor incondicional que fue nuestra motivación para culminar con éxito nuestros estudios universitarios.

Julieta y Gabriel son el sol de mi vida.

A ti Pablo por llegar a mi mundo y apoyarme.

RESUMEN

Las microalgas poseen compuestos bioactivos con una amplia gama de actividades biológicas. En este proyecto, se evaluaron seis extractos etanólicos (96% EtOH) de microalgas extraídas de sistemas lacustres ecuatorianos que fueron probados en ensayos antibacterianos (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngicos (*Candida albicans*), antioxidantes, leishmanicida (*Leishmania mexicana*), antihelmíntico (*Panagrellus redivivus*) y de citotoxicidad (macrófagos murinos RAW 264.7).

Para evaluar sus propiedades antimicrobianas y de citotoxicidad, los ensayos antibacterianos y antifúngicos se realizaron usando la técnica de difusión en agar en cajas Petri. Los ensayos antioxidantes, antihelmíntico, antileishmania y citotoxicidad se realizaron mediante el método del MTT.

Los resultados preliminares para los ensayos antihelmíntico y antifúngico fueron nulo. Para el ensayo antibacteriano resultó nulo para *E. coli*; en cambio para el ensayo antibacteriano contra *S. aureus* fue moderado. Finalmente los resultados obtenidos en los ensayos: antioxidante, citotóxico y leishmanicida fueron moderado.

ABSTRACT

Microalgae have bioactive compounds with a wide range of biological activities. In this project, six ethanolic extracts (96% EtOH) of microalgae extracted from Ecuadorian lacustrine systems were tested and tested in antimicrobial (*Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*), antifungals (*Candida albicans*), antioxidants, leishmanicida (*Leishmania mexicana*), anthelmintic (*Panagrellus redivivus*) and cytotoxicity (murine macrophages RAW 264.7).

To assess its antimicrobial and cytotoxicity properties, antibacterial and antifungal assays were performed using the agar diffusion technique in Petri dishes. Antioxidant, anthelmintic, antileishmania and cytotoxicity assays were performed by the MTT method.

The preliminary results for anthelmintic and antifungal assays were null. For the antibacterial assay it was found to be null for *Escherichia coli*; in contrast the antibacterial assay against *S. aureus* was moderate. Finally the results obtained in the antioxidant, cytotoxic and leishmanicidal assays were moderate.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	4
1.3. Objetivos.....	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación	6
2. Capítulo II. Marco Teórico.....	7
2.1. Microalgas: Generalidades	7
2.1.1. Taxonomía y morfología.....	7
2.1.3. Aplicaciones de las microalgas.....	8
2.2. Ensayo antibacteriano	10
2.2.1. Organismos modelos.....	10
2.2.2. Antibióticos comunes utilizados	12
2.3. Ensayo Antifúngico	13
2.3.1. Organismo modelo	13
2.3.2. Antifúngicos comunes utilizados.....	14
2.4. Ensayo leishmanicida	15
2.4.1. Organismo modelo	15
2.4.2. Leishmaniasis	15
2.4.3. Fármacos contra la Leishmaniasis	16
2.5. Ensayo nematocida.....	16
2.5.1. Organismo modelo	17
2.6. Ensayo antioxidante	17
2.7. Citotoxicidad.....	18

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental.....	19
4. Capítulo IV. Procedimientos.....	22
4.1. Población y muestra	22
4.2. Materiales y métodos.....	23
4.2.1. Siembra y cultivo de microalgas	23
4.2.2. Preparación de extractos.....	24
4.2.3. Ensayos antimicrobianos	26
4.2.4. Ensayo leishmanicida.....	27
4.2.5. Ensayo nematicida	29
4.2.6. Ensayo antioxidante	31
4.2.7. Ensayo de Citotoxicidad	34
4.2.8. Cálculo de la Concentración Inhibitoria media IC50.....	35
4.2.9. Análisis estadísticos	35
5. Capítulo V: Resultados y Discusión.....	35
5.1. Ensayo antimicrobiano	35
5.2. Ensayo nematicida.....	38
5.3. Ensayo antioxidante	39
5.4. Ensayo leishmanicida	41
5.4.1. Consorcio <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	41
5.4.2. <i>Chlorrella</i>	42
5.4.3. <i>Chlorococcum</i>	43
5.4.4. <i>Chlorococcus</i>	44
5.4.5. <i>Scenedesmus</i>	45
5.4.6. <i>Synechococcus</i>	46
5.5. Ensayo de citotoxicidad	48
5.5.1. <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	48
5.5.2. <i>Chlorrella</i>	49
5.5.3. <i>Chlorococcum</i>	50

5.5.4. <i>Chlorococcus</i>	51
5.5.5. <i>Scenedesmus</i>	52
5.5.6. <i>Synechococcus</i>	53
5.5.7. Cálculo de la Concentración Inhibitoria Mínima IC50	54
5.5.8. Resultados globales	56
6. Conclusiones y recomendaciones	58
6.1. Conclusiones	58
6.2. Recomendaciones	59
REFERENCIAS	59
ANEXOS.....	73

1. Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

El Ecuador es un país megadiverso, por su alta riqueza biológica, sin embargo la biodiversidad de los microorganismos no ha sido estudiada a profundidad. Los pisos climáticos, los nutrientes en el agua y suelo han permitido el crecimiento de diversos microorganismos como lo son las microalgas (Laboratorio de Biotecnología Energética, 2016).

En Ecuador, la Corporación para la Investigación Energética (CIE) creó el Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC) con auspicio de la Empresa Eléctrica Quito en el 2013. El BIOTEC ha enfocado su investigación en la biodiversidad de microalgas, grupo de microorganismos escasamente estudiados en el Ecuador. La riqueza biológica es conservada a través de una Colección de microalgas para Investigación del Ecuador (CMIE), cepas que son utilizadas en diferentes aplicaciones biotecnológicas y ambientales. (Laboratorio de Biotecnología Energética, 2016).

El Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) creó el área de investigación de Biodiversidad y Bioproductos debido a la gran biodiversidad existente en nuestro país, con el fin de estudiar a microorganismos con un potencial benéfico, como lo son las microalgas. El incentivo se basa en el patrocinio a investigadores que desarrollan estudios de investigación como el proyecto *Semilla* que se basa en el “Estudio del potencial antimicrobiano y antiinflamatorio de las microalgas nativas aisladas de sistemas lacustres representativos de la Amazonia y Andes Ecuatorianos”. Como parte de este proyecto se ha realizado el presente trabajo de titulación, con el fin de estandarizar protocolos que serán utilizados en posteriores etapas de la investigación.

Los estudios de biotecnología aplicada a las microalgas han ganado enorme éxito en el mundo, debido a la capacidad de estos microorganismos para producir biomoléculas con actividad biológica importante. Este éxito depende principalmente de las condiciones óptimas del cultivo y de los productos que se desee obtener (Raja, Hemaiswarya, Kumar, Sridhar, & Rengasamy, 2008).

Por su distribución a lo largo de diversos ecosistemas, las microalgas son capaces de sintetizar innumerables compuestos bioquímicos como: hidratos de carbono, lípidos, pigmentos, proteínas y diversos compuestos bioactivos (Yu, Chen, & Zhang, 2015). Por lo tanto, son la principal fuente natural para el descubrimiento de nuevos metabolitos que puedan ser utilizados en el campo biotecnológico, médico e industrial; a comparación de otras fuentes biológicas (Mimouni, Ulmann, Pasquet, & Laurent, 2015).

Se ha estimado que existen entre 22.000 y 26.000 especies de microalgas, de las cuales sólo unas pocas se han identificado para ser utilizadas por su importancia comercial como: *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum* y *Porphyridium* (Raja, et al., 2008). Su uso incluye varios productos alimenticios saludables (*Haematococcus pluvialis*, *Scenedesmus acutus*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis* sp) (Mimouni, et al., 2015) biofertilizantes y cosméticos (Ibañez & Cifuentes, 2013).

Adicionalmente, están siendo cultivadas por su gran capacidad de síntesis de metabolitos secundarios como luteína, carotenos, ácido ascórbico y tocoferol (Ibañez & Cifuentes, 2013). Todos estos compuestos no solo son importantes como pigmentos naturales o aditivos, también pueden ser útiles en la disminución de la incidencia de cáncer, reduciendo los radicales libres y el colesterol en la sangre (Greque de Morais, Da Silva, Greque de Morais, & Vieira, 2015)

Una serie de compuestos antioxidantes han sido identificados a partir de *Glomerata cladophora* y *Microspora floccosa* (Laungsuwon & Chulalaksananukul, 2013) estas especies tienen un sistema de defensa capaz de proteger a las células de los radicales libres, prevenir úlceras gástricas, evitar la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, demostrando ser una fuente potencial de compuestos biológicamente activos que pueden usarse como agentes terapéuticos (Munir, Sharif, Naz, & Manzoor, 2013).

Además de los metabolitos secundarios antes mencionados, las microalgas son capaces de sintetizar terpenoides y polisacáridos fucoidanos, los cuales poseen propiedades antiproliferativas, antitumorales y anticancerígenas. Siendo así, se podrían desarrollar fármacos a base de microalgas como alternativa a los tratamientos químicos convencionales de la medicina tradicional (Ibañez & Cifuentes, 2013)

Otra gran variedad de microalgas están siendo estudiadas por su potencial biológico para el control de enfermedades tropicales de importancia en el mundo como es el caso de la Leishmaniasis. (Ribeiro, et al., 2014), (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2015).

Debido a la aparición de microorganismos resistentes a antibióticos, se han desarrollado investigaciones que consideran a las microalgas posibles candidatas para el desarrollo de nuevos antibióticos, debido a su alto contenido en compuestos metanólicos.

Según Sanmukh y colaboradores 2014, los extractos de metanol y de acetato de etilo de *Chorella* sp y *Chlamydomonas* sp. fueron eficaces contra cepas bacterianas de *Staphylococcus* sp. y *Escherichia coli*, demostrando así la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos contra patógenos resistentes a múltiples fármacos a partir de microalgas (Danyal, Mubeen, & Malik, 2013).

1.2. Planteamiento del problema

En los últimos años la Biotecnología de microalgas se ha convertido en un tema de estudio para diversos campos, debido a los compuestos activos que se pueden obtener a partir de estos microorganismos, sin embargo la biodiversidad de microalgas no se ha explorado en su totalidad alrededor del mundo (Greque de Morais, et al., 2015).

En el Ecuador se han realizado estudios de biodiversidad, centrados principalmente en la flora y fauna que coexisten en las cuatro regiones del país, sin prestar mayor importancia a la biodiversidad de las microalgas, y a su potencial como fuentes de biocompuestos de interés comercial (Laboratorio de Biotecnología Energética, 2016).

En las últimas cinco décadas, el aumento de la resistencia de cepas de bacterias a los fármacos, incluidos los antibióticos, impulsan a investigar nuevos compuestos que permitan prevenir o controlar las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos (Mimouni, et al., 2015).

No sólo la resistencia sino también el costo de elaboración de productos químicos sintéticos, llevan a la búsqueda de medicinas alternativas tales como, compuestos antimicrobianos, antifúngicos y leishmanicidas, provenientes de fuentes naturales como lo son las microalgas (Yu, et al., 2015). Sin embargo, es necesario comprobar su inocuidad antes de ser utilizadas en mamíferos, mediante pruebas de citotoxicidad, inicialmente empleando células RAW 254.7.

Siendo así, con esta investigación se desea determinar los diferentes compuestos bioactivos derivados de microalgas que presenten actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, nematocida y leishmanicida que pudieran ser utilizados como fármacos, promoviendo la salud controlando enfermedades infecciosas, las

mismas que poseen una alta prevalencia e incidencia en países en vías de desarrollo como el Ecuador.

Adicionalmente, el presente trabajo resume claramente la importancia de seis extractos de microalgas nativas que tienen potencial como antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, nematicida y leishmanicida. Tomando en cuenta análisis de citotoxicidad y concentración inhibitoria media IC50. Obteniendo información útil para nuevas investigaciones que permitan el descubrimiento de nuevos fármacos en nuestro país.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

- Determinar compuestos bioactivos de extractos de microalgas con respuesta antibacteriana, antifúngica, antioxidante, nematicida, leishmanicida y de citotoxicidad.

1.3.2. Objetivos específicos

- Seleccionar cepas puras de microalgas de áreas protegidas representativas del Ecuador.
- Determinar la actividad biológica antibacteriana, antifúngica, antioxidante, nematicida, leishmanicida y de citotoxicidad de extractos de microalgas.

1.4. Justificación

Los avances en las investigaciones de los biorecursos de microalgas y su producción comercial se han dado a conocer en las últimas décadas. Varias investigaciones (Volk & Furbert, 2006), (Bhagavathy, Sumathi, & Jancy, 2011) han demostrado la viabilidad y eficiencia económica de los metabolitos de las microalgas para sus diferentes usos en la industria médica, farmacéutica, cosmética, alimentaria y energética (Greque de Morais, et al., 2015).

Promover la investigación de microalgas debe llevarse a cabo para verificar sus efectos beneficiosos para los seres humanos, su biodegradabilidad cuando se libera en el medio ambiente, y sus efectos cuando se usan en animales (Cuellar, et al., 2014).

Las microalgas nativas del Ecuador al ser poco estudiadas son de gran interés para la industria, por ello el objetivo de este estudio es el descubrimiento de características antibacterianas, antifúngicas, leishmanicidas, nematocidas y antioxidantes presentes en las microalgas y que además sean de relevancia para su posterior uso.

En este estudio adicionalmente se identificarán a las microalgas con capacidad de síntesis de compuestos bioactivos a nivel de género, basándose en sus características morfologías y fisiológicas.

Esta información puede resultar muy útil para la investigación y el descubrimiento de nuevos fármacos en el Ecuador, para su aplicación contra enfermedades infecciosas de tipo bacteriano, fúngico y leishmanicida.

2. Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Microalgas: Generalidades

2.1.1. Taxonomía y morfología

Existe una gran variedad de diferentes tipos de microalgas, entre las más comunes se incluyen:

- **Cianobacterias:** son microalgas Verdi azules, que pueden crecer formando colonias o filamentos Las algas Verdi azules (cianobacterias). Siempre de color verde azulado debido a su pigmento accesorio llamado ficocianina, son microorganismos procarióticos y por lo tanto no poseen organelos celulares (Newcombe, House, Ho, Baker, & Burch, 2010).
- **Clorofíceas:** son microalgas verdes que presentan un cloroplasto grande donde almacenan almidón y otras sustancias de reserva. Adicionalmente contienen pigmentos como clorofila A, B, carotenos y xantofilas. Sus células tienen forma aplanada por su falta de movilidad, lo que provoca una fricción con el agua lo que causa que solo las encontremos flotando sobre la corriente de agua (Skacelova, Bartak, Coufalik, Nyvtl, & Trnkova, 2013)

2.1.2. Hábitat y nutrición

La mayoría de microalgas son consideradas como fotoautótrofas, es decir que dependen de su aparato fotosintético para cubrir sus necesidades metabólicas, utilizando la luz del sol como fuente de energía y el CO₂ como fuente de carbono para producir carbohidratos y ATP (Belinger & Sigee, 2010).

Otras especies de algas son heterótrofas incoloras que obtienen el carbono orgánico del ambiente exterior, ya sea mediante la osmosis de sustancias disueltas (osmotrofía) o por la fagocitosis de bacterias u otras células o partículas celulares (fagotrofía) (Belinger & Sigee, 2010).

Es ampliamente aceptado que las algas utilizan una serie de estrategias nutricionales para el correcto funcionamiento de sus funciones vitales mediante la combinación de los mecanismos de nutrición de fotoautotrofía y heterotrofía, lo que se conoce como mixotrofía, este tipo de algas utilizan una fuente de carbono del exterior y otras pueden utilizar productos de la fotosíntesis de los cloroplastos de las células fagocitadas (Barsanti & Gualteri, 2006).

2.1.3. Aplicaciones de las microalgas

Las microalgas y macroalgas han sido utilizadas por los seres humanos desde hace miles de años como alimentos, fertilizantes, medicinas y forraje. Registros antiguos indican que en el año 500 a.C., los humanos recogían macroalgas para su alimentación (Mimouni, et al., 2015).

Su producción a gran escala, se limita al cultivo en estanques abiertos de especies como *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Arthrospira* y *Chlorella*. Estas algas son fuente de carotenoides, vitaminas, pigmentos y proteínas de bajo costo, que pueden utilizarse para la producción (Harun, Singh, & Forde, 2010) de productos nutracéuticos, farmacéuticos, aditivos de alimentos para animales y cosméticos (Barsanti & Gualteri, 2006).

A continuación se describen a fondo las aplicaciones de las microalgas en la industria farmacéutica (Harun, et al., 2010).

2.1.3.1. Industria farmacéutica

Las microalgas son fuentes de metabolitos secundarios biológicamente activos, de los cuales muchos están siendo estudiados como nuevos fármacos. La producción de biomoléculas en sistemas naturales ofrece ventajas significativas cuando se compara con la síntesis química, las moléculas de origen natural son mucho más solubles en agua, permeables a través de membranas y en la mayoría de los casos son biodisponibles sin necesidad de un tratamiento adicional (Geetha, Navasakthi, & Padmini, 2010).

La importancia de las microalgas como fuentes de ingredientes funcionales ha sido reconocida por sus efectos beneficiosos para la salud. Un ejemplo claro de compuestos beneficiosos para la salud son los pigmentos que son fuentes de compuestos bioactivos (Geetha, et al., 2010).

Estos pigmentos tienen diversas propiedades biológicas beneficiosas tales como: antioxidante, anticancerígeno, antiinflamatorio y antiobesidad, además están siendo indicados para el tratamiento y prevención de las enfermedades crónicas (Mikami & Hosokawa, 2013).

El potencial antioxidante de los pigmentos carotenoides de origen microalgal y su capacidad para prevenir el cáncer, el envejecimiento, la aterosclerosis, enfermedades del corazón y las enfermedades degenerativas ha sido descrito en varios estudios clínicos (Mikami & Hosokawa, 2013).

Las proteínas de microalgas son de gran interés como fuente de péptidos bioactivos debido a su potencial terapéutico en el tratamiento de diversas enfermedades. Dentro de estos compuestos se incluyen a factores de crecimiento, hormonas e inmunomoduladores, cuya función principal es la de ayudar a reemplazar los tejidos dañados (Volk & Furbert, 2006)

Adicionalmente se pueden utilizar como nutracéuticos o incluidos en los alimentos funcionales para prevenir enfermedades y daños a las células y tejidos debido a sus contenido de proteínas y aminoácidos (Greque de Morais, et al., 2015).

2.2. Ensayo antibacteriano

Las necesidades de desarrollo de agentes antibióticos alternativos se han investigado desde la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos. Debido a la aparición de patógenos resistentes a los fármacos, que ponen en peligro a las personas, se han desarrollado ensayos antibacterianos poniendo a prueba los compuestos bioactivos microalgales que se han encontrado eficaces contra la mayoría de los patógenos *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Salmonella* (Sanmukh, et al., 2014), (Bhagavathy, et al., 2011).

2.2.1. Organismos modelos

- *Escherichia coli*:

E. coli fue el primer organismo modelo de la historia, pues se usó con gran frecuencia en estudios de fisiología bacteriana por su fácil manipulación, su rápido crecimiento y su adaptación a medios de cultivo mínimos (Sondi & Salopek, 2004).

E. coli es una enterobacteria bacteria Gram negativa móvil, perteneciente al género *Escherichia*, capaz de fermentar la lactosa y la glucosa, con producción de gas y ácidos. Sus células son de forma de varilla, de alrededor 2.5 mm de largo y 0.8 mm de diámetro, en sus extremos presentan orgánulos en forma de tapas semiesféricas (Berg, 2004)

En cuanto a sus necesidades nutricionales, *E. coli* es una bacteria poco exigente y es muy resistente a los agentes externos, pueden crecer y desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, además pueden ser cultivadas en medios de cultivo mínimos incluso a temperaturas de 45°C, siendo esta última la característica que permite diferenciarlas de las demás bacterias coliformes (Salmani, Azarnehad, Reza, & Hosseini, 2016)

Escherichia coli forma parte de la flora intestinal normal, pero algunos tipos de *E. coli* causan enfermedades. Existen seis patótipos de *E.coli*, incluyendo *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroagregante (EAaggEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli*. adherente difusamente (Allocati, et al., 2013).

- ***Staphylococcus aureus***

Staphylococcus aureus es causa importante de infecciones nosocomiales en todo el mundo. Está presente como una parte de la flora normal de los seres humanos y coloniza la piel, pero puede llegar a ser patógeno y dar lugar a infecciones menores de la piel, abscesos y a las enfermedades potencialmente mortales como la neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome de shock tóxico (SST), la septicemia, mastitis, flebitis, infecciones del tracto urinario, osteomielitis y endocarditis (Brown, Leech, Rogers, & McLoughlin, 2014).

Su patogenicidad se debe a las toxinas de invasión que sintetiza y a su resistencia a los antibióticos (Naber, 2009) lo que lo convierte en un serio problema de salud (Zendejas, Ávalos, & Soto, 2014)

En humanos *Staphylococcus aureus* provoca una gran variedad de enfermedades infecciosas, pero su principal impacto se debe a las cepas de *S. aureus*, que son extremadamente resistentes a la meticilina (MRAS) y otros antibióticos que fueron una vez eficaces contra su tratamiento (Zendejas, et al., 2014).

2.2.2. Antibióticos comunes utilizados

- Penicilina:

Es un antibiótico que mata células bacterianas, impidiendo que continúen con su crecimiento (Valdéz, et al., 2008, p. 6). Su estructura química es el ácido 6 aminopenicilánico, formado por una estructura β -lactámico-tiazolidínica anillada como se muestra en la figura 1.

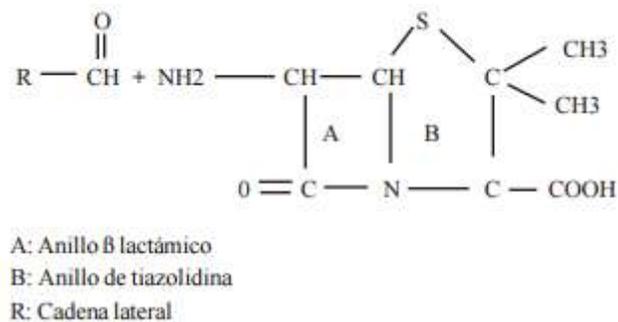


Figura 1: Estructura química de la penicilina

Tomado de Valdéz, et al.,2008, p.6

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de los péptidos glicanos, que son sustancias que le confieren la forma rígida y de proporcionan estabilidad a la membrana celular de las células bacterianas. Por ello la penicilina solo puede combatir a aquellos microorganismos que se encuentren en fase de crecimiento y no a aquellos que se encuentren en fase latente (Marín M. , 2011).

2.3. Ensayo Antifúngico

El estudio de la resistencia a los agentes antifúngicos se ha quedado muy por detrás de la resistencia antibacteriana, debido a que los hongos no han sido reconocidos como patógenos importantes. El aumento asociado en las infecciones por hongos provocó la búsqueda de nuevos y más seguros agentes para combatir las infecciones por hongos, como es el caso de las microalgas (Sanmukh, et al., 2014), (Volk & Furbert, 2006).

2.3.1. Organismo modelo

- ***Candida albicans*:**

Candida albicans es un residente normal del tracto gastrointestinal de los humanos y otros animales de sangre caliente. Tiene una gran capacidad de supervivencia y puede proliferar en diversos ambientes ya que se adapta con facilidad a cambios en la atmosfera, oxígeno, dióxido de carbono, pH, nutrientes y temperatura (Simoës, et al., 2016).

Presenta una forma de tipo circular, su pared celular es dinámica y compleja, posee una estructura estratificada externa a la membrana plasmática que es responsable del mantenimiento de la forma que caracteriza cada forma de crecimiento (principalmente levaduras e hifas) del hongo (Gleiznys, Zdanaviciene, & Zilinskas, 2015).

C. albicans es capaz de adherirse a células y tejidos de otros organismos; para esto expone sus proteínas de superficie como adhesinas y otros factores (Fourie, et al., 2016) patógenos causantes de su patogenicidad.

El estadio de crecimiento en el que se encuentre también influye para su patogenicidad, la forma hifal permite que el patógeno penetre en los tejidos para adquirir nutrientes o escapar del sistema de defensa del huésped, a su vez las células de levadura se diseminan a través del cuerpo del huésped (Fourie et al., 2016).

2.3.2. Antifúngicos comunes utilizados

- Anfotericina B:

Es un antifúngico de amplio espectro. Su estructura química consta de una parte hidrófila de varios carbonos hidroxilados, una parte hidrófoba que consta de siete átomos de carbono unidos por enlaces dobles y una cadena lateral de micosanina (aminodesoxihenosa) que se puede observar en la figura 2. (Catalán & Montejó, 2006, pág. 42).

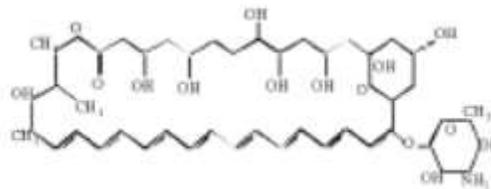


Figura 2. Estructura química de la anfotericina B

Tomado de Catalán y Montejó, 2006, p. 42

Su mecanismo de acción se basa en la unión a los esteroides de las membranas fúngicas, como consecuencia de esta fijación se producen alteraciones en la estructura de la membrana, esto debido a la formación de poros compuestos de anfotericina B y esteroides, los

cuales debilitan la pared celular y seguidamente se produce la lisis de la célula (Catalán & Montejo, 2006, pág. 42)

2.4. Ensayo leishmanicida

2.4.1. Organismo modelo

- ***Leishmania mexicana***

Leishmania mexicana es un parásito unicelular (Fernandez, Rangel, Espinosa, Carillo, & Salazar, 2012). Su ciclo de vida incluye dos etapas de desarrollo: flagelado o etapa móvil "promastigote" y la no flagelado o etapa móvil "amastigote (Akhoundi, et al., 2016).

La *Leishmania* perdura en los intestinos de los mosquitos como promastigotes extracelulares, flagelados y móviles. Por el contrario, en huéspedes mamíferos, los parásitos sobreviven y se replican en el interior de los fagocitos de la célula huésped como amastigotes intracelulares (Bañuls, Hide, & Prugnolle, 2007).

La ingestión de cuerpos apoptóticos y vesículas de membrana que contienen parásitos viables por los fagocitos circundantes permite una silenciosa propagación de la infección (Bañuls, et al., 2007).

2.4.2. Leishmaniasis

La leishmaniasis son un conjunto de enfermedades transmitidas por vectores, causadas por un parásito protozoario intracelular del género *Leishmania* sp. A pesar de que la enfermedad ha sido conocida y estudiada durante mucho tiempo,

aún se considera como un problema de salud pública en todo el mundo. (Bañuls, et al., 2007).

2.4.3. Fármacos contra la Leishmaniasis

Las terapias para combatir la Leishmaniasis con medicamentos, incluyen compuestos químicos derivados del antimonio pentavalente, pentamidina, anfotericina B, y miltefosina, cada una con diferentes mecanismos de acción. La anfotericina B es un agente antifúngico que causa lisis celular del parásito. La pentamidina interfiere con la replicación y la transcripción del material genético y la miltefosina se cree que interrumpe a los receptores de la superficie celular inhibiendo su adhesión a las paredes de las células del huésped (Christensen, Mc Lauchlan, Dolbecq, Mialane, & Jones, 2016).

Estas terapias son en su mayoría por vía sistémica, sin embargo, ninguno de estos fármacos ha logrado cumplir satisfactoriamente el tratamiento de la Leishmaniasis, pues son medicamentos de alto costo y su toma prolongada puede causar resistencia a los antimoniales pentavalentes (Rooney, Piening, Buscher, Roge, & Smales, 2015).

2.5. Ensayo nematicida

Las infecciones por nemátodos intestinales representan una amenaza debilitante para el ganado y los animales domésticos en todo el mundo, ya que puede causar reducción en el crecimiento y el aumento de peso y, dependiendo de la gravedad de la infección, puede conducir a la muerte de los animales (Ferreira, et al., 2015).

La resistencia de los nemátodos a los fármacos ha sido reportada para el ganado, destacando la importancia para el desarrollo de nuevos compuestos antihelmínticos (Ferreira, et al., 2015). Compuestos bioactivos de las microalgas

han sido estudiados para determinar su potencial nematicida, utilizando como organismo modelo la especie *Panagrellus redivivus*. Un compuesto que resulte letal para este nematodo puede resultar en el desarrollo de nuevos fármacos para el control de enfermedades causadas por los nemátodos (Global Institute for Bioexploration, 2014).

2.5.1. Organismo modelo

- **Panagrellus redivivus**

Es un nematodo de vida libre que se alimenta de una gran variedad de microorganismos. Son gusanos de color blanco sin segmentos en su cuerpo, son de tamaño pequeño menores a 1.5 mm. (Luna, 2009). Pueden crecer en medios con hojuelas de avena humedecidas con algún tipo de aceite, puesto que se alimentan de los ácidos grasos y de compuestos lipídicos (Lara, Castro, Castro, & Castro, 2007)

2.6. Ensayo antioxidante

Las microalgas han sido reconocidas como fuente de ingredientes, entre los compuestos funcionales identificados en ellas se encuentran los pigmentos naturales (Guedes, Amaro, & Malcata, 2011).

Los pigmentos naturales que se encuentran en las microalgas son clorofilas y carotenoides. Las clorofilas son pigmentos fotosintéticos verdes (Cuellar, et al., 2014). Los carotenoides son polienos lineales que actúan como recolectores de energía y luz y además son antioxidantes que inactivan a las partículas ROS, formadas por la exposición de las células al estrés ambiental (Cuellar, et al., 2014).

Los ensayos de determinación de la actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Los radicales libres reaccionan con la muestra de interés y si tuviera una capacidad antioxidante, se inhibiría la formación de más radicales libres. Así lo que se determina realmente es el efecto antioxidante pues la actividad antioxidante no se puede medir de forma directa (Agudo, 2010)

Existen varias formas para determinar el efecto antioxidante una de estas es la determinación directa, que consiste en emplear al radical libre como un factor de cuantificación es decir que produce una señal analítica. Al adicionar la sustancia antioxidante la señal disminuye. En este tipo de ensayos se añade sustratos de oxidación antes que sea generado el radical libre, como es el caso del oxidante ABTS (Kuskoski, Asuero, García, Troncoso, & Fett, 2004)

2.7. Citotoxicidad

Las microalgas contienen varios compuestos biológicamente activos que se han utilizado como fuentes de agar, carragenatos, alginatos, proteínas, ácidos grasos insaturados, vitaminas y minerales. Por lo tanto, se utilizan en muchas industrias como productos farmacéuticos, textiles, alimentos humanos y para el tratamiento de algunas enfermedades (Mosaddegh, et al., 2014)

Adicionalmente las microalgas producen una amplia gama de nuevos metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas que conducen al desarrollo de nuevos agentes farmacéuticos y juegan un papel importante en la producción de productos farmacéuticos, es por ello que varias investigaciones han evaluado el potencial citotóxico de los extractos microalgales para determinar a qué concentración los extractos no resultan tóxicos para la salud humana (Mosaddegh, et al., 2014)

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

Se realizó un diseño experimental de Bloque Completamente al Azar (DBCA), de cinco tratamientos más dos controles, con la finalidad de determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos y los controles. Se ejecutaron seis ensayos que fueron desarrollados por triplicado que se observan en la tabla 1

Tabla 1.

Diseño experimental de los ensayos antioxidante, leishmanicida, citotoxicidad, antifúngico, nematocida y antibacteriano

DESCRIPCIÓN							
Tratamientos	Concentración	Ensayos					
		Antioxidante	Leishmanicida	Citotoxicidad	Antifúngico	Nematocida	Antibacteriano
C+		Ácido ascórbico	Anfotericina	Podofilotoxina	Anfotericina	CuSO ₄	Penicilina
C-		Etanol	Etanol	Etanol	Etanol	Etanol	Etanol
E1	D1-D5						
E2	D1-D5						
E3	D1-D5						
E4	D1-D5						
E5	D1-D5						

Nota: C+: control positivo; C-: control negativo; E1,E2,E3,E4,E5: extractos microalgales; D1-D5: diluciones de los extractos microalgales

Adicionalmente se realizó un Análisis de Varianza para los ensayos leishmanicida y de citotoxicidad, con cinco tratamientos, dos controles, tres repeticiones por cada

ensayo, promedio y desvío estándar que se observan en la tabla 2 para el ensayo leishmanicida y en la tabla 3 para el ensayo de citotoxicidad.

Tabla 2.

Análisis de varianza para el ensayo leishmanicida.

ENSAYO LEISHMANICIDA								
Tratamientos	Extractos						X	δ
	<i>Chlorrella y Scenedesmus</i>	<i>Chlorrella</i>	<i>Chlorococcum</i>	<i>Chlorococcus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Synechococcus</i>		
C	R1;R2;R	R1;R2;R	R1;R2;R	R1;R2;R	R1;R2;R	R1;R2;R		
C-								
D								
D								
D								
D								
D								

NOTA: X: promedio; δ: desvío estándar, R1,R2,R3: repeticiones

Tabla 3.

Análisis de varianza para el ensayo de citotoxicidad.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD								
Tratamientos	Extractos						X	δ
	<i>Chlorrella y Scenedesmus</i>	<i>Chlorrella</i>	<i>Chlorococcum</i>	<i>Chlorococcus</i>	<i>Scenedesmus</i>	<i>Synechococcus</i>		
C+	R1;R2;R3	R1;R2;R3	R1;R2;R3	R1;R2;R3	R1;R2;R3	R1;R2;R3		
C-								
D1								
D2								
D3								
D4								
D5								

NOTA: X: promedio; δ: desvío estándar, R1,R2,R3: repeticiones

4. Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y muestra

Para este proyecto de titulación la población seleccionada corresponde a los Parques Nacionales del Ecuador, mientras que la muestra corresponde a lagunas de donde fueron colectadas. Se observan las seis cepas y los lugares de colección de las muestras en la tabla 4.

Tabla 4.

Lugares de colección y muestreo de las cepas microalgales

Código de la cepa	Lugar de colecta	Medio de cultivo
Consortio Chlorrella y Scenedesmus	Reserva Ecológica Cayambe Coca Laguna Oyacachi	BG-11
<i>Scenedesmus</i>	Parque Nacional Cotacachi Cayapas Laguna El Salado	BG-11
<i>Synechococcus</i>	Parque Nacional Cotopaxi Laguna Santo Domingo	BB
<i>Chlorrella</i>	Reserva Faunística Chimborazo Laguna Colta	BG-11
<i>Chlorococcum</i>	Parque Nacional Llanganates Laguna Chaloacochoa	BB
<i>Chlorococcus</i>	Parque Nacional Llanganates Laguna Chaloacochoa	BB

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Siembra y cultivo de microalgas

4.2.1.1. Colección, aislamiento e identificación

La colecta de las muestras para el aislamiento de las cepas Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Scenedesmus*, *Synechococcus*, *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, fue previamente realizado por Guamán y González (2015), en diferentes zonas lacustres protegidas de los Andes y Amazonía del Ecuador bajo el permiso de investigación No. 002-14 IC-MC-DNB/MA emitido por el Ministerio del Ambiente (MAE) y el Contrato Marco de Acceso de Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-0012. La identificación morfológica se realizó por observación de los caracteres morfológicos que fueron comparados con claves taxonómicas (Smith, G.M. 1950; Prescott, G.W. 1962; Patrick, R Reimer, C.W. 1975; Patterson, D.J., Hedley. 1992; Patterson, D.J. 1996; Wehr, J.; Sheath, R. 2003; Bellinger, W., Sigee, D. 2010; Spaulding, S.A. et al., 2010; Jason Oyadomari. 2011; Serediak, N., Huynh, M.L. 2011; Baker et al., 2012; Song, L. 2013; Guiry, M.D.; Guiry, G.M. 2015). Estos registros fueron digitalizados junto a las mediciones de las células (Guamán y González, 2016).

4.2.1.2. Cultivo de microalgas

Las cepas de microalgas Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Scenedesmus*, CMIE-A1-004, *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, fueron previamente aisladas por Guamán y González (2016). Las colonias puras de microalgas se cultivaron en cajas con medio sólido BG-11 (Rippka et al., 1979) y BB (Bold Basal Medium) (Bold, 1949; Bischoff y Bold, 1963) ANEXO 13, posteriormente fueron cultivadas en tubos de 50 mL utilizando medio líquido BG-11 y BB como se describe en (Andersen, 2005).

Los cultivos crecieron durante 15 días a 25 °C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Pasados los 15 días se escalaron las cepas para obtener un volumen final de 10 Litros. Una vez transcurrido el tiempo de escala de laboratorio, la biomasa fue cosechada por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue transferido a nuevos tubos para ser lavado de dos a tres veces con agua destilada autoclavada (Richmond & Hu, 2013).

Posteriormente, se almacenaron los tubos a -4 °C, para liofilizarlos durante 36 horas y almacenarlos a -80 °C hasta el momento de preparar los extractos microalgales.

4.2.2. Preparación de extractos

4.2.2.1. Maceración

Se pesó la biomasa seca de cada cepa de microalga liofilizada y se colocaron en frascos de borosilicato de 250 mL. Se adicionaron 50 mL de solvente (etanol 95%), se agitó a 170 rpm durante 24 horas a 35° C y se filtró cada muestra con jeringuillas de 30 mL. Para la filtración se utilizaron discos circulares de papel filtro de 0.32 mm que se colocaron dentro de cada jeringuilla. El volumen filtrado de cada muestra se colocó en nuevos frascos de borosilicato y se almacenó a 4 °C (Prakash, Antonisamy, & Jeeva, 2011).

La biomasa sobrante en las jeringuillas se traspasó a frascos de borosilicato y se colocaron 50 ml de solvente (etanol 95%), se taparon los frascos y se los llevó a un shaker a 170 rpm durante 24 horas y 35 °C. El proceso de extracción se repitió en un total de tres veces, la segunda y tercera vez a 200 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas. El volumen total de solvente que se utilizó fue de 150 mL (Prakash, et al., 2011).

4.2.2.2. Concentración del extracto

El volumen de las seis muestras, obtenido al final de las extracciones sucesivas, fue de 150 mL, se colocó en balones y se sometió a una recuperación total de solvente usando un rotavapor durante 50 a 200 minutos, a 43 mbar de presión y 35°C (Pereira, et al., 2015).

Los extractos crudos de las seis cepas se resuspendieron en 5 mL de solvente (etanol al 95% y metanol 90%), durante cinco minutos y se procedió a secar las muestras en el rotavapor durante una hora a 4 mbar de presión y 35°C. Finalmente se resuspendieron las seis muestras en 30 mL de etanol al 95% (Pereira, et al., 2015). Los seis extractos concentrados obtenidos se colocaron en microtubos y se almacenaron a -80°C para ser utilizados posteriormente en los ensayos: antioxidante, antifúngico, leishmanicida, antibacteriano, nematocida y citotoxicidad.

A partir de los seis extractos se realizaron diluciones con concentraciones finales que se observan en la tabla 5.

Tabla 5.

Concentraciones finales de los seis extractos microalgales en µg/mL

EXTRACTOS	CONCENTRACION µg/mL
Consortio <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	1328
<i>Chlorrella</i>	697,2
<i>Chlorococcum</i>	697,2
<i>Chlorococcus</i>	8266,8
<i>Scenedesmus</i>	597,6
<i>Synechococcus</i>	597,6

4.2.3. Ensayos antimicrobianos

4.2.3.1. Cepas bacterianas

Los cepas bacterianas utilizadas para el ensayo antibacteriano fueron *Escherichia coli* (como especie Gram positiva) y *Staphylococcus aureus* (como especie Gram negativa) y se obtuvieron del laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

Ambas cepas fueron cultivadas en agar Mueller Hinton a 37° C durante 24 horas.

4.2.3.2. Ensayo antibacteriano

Se evaluó la actividad antibacteriana usando la técnica de difusión en disco en cajas Petri (Hassan, et al., 2015). Los discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro se cargaron con 20 uL de los seis extractos microalgales y se secaron al aire. Adicionalmente se usaron discos que contenían 20 uL de penicilina (1200 mg/mL) como control positivo y discos con 20 uL de etanol 95% como control negativo.

Finalmente, todos los discos se colocaron en cajas con medio sólido Muller Hinton en las que previamente se inoculó los microorganismos mencionados anteriormente (Hassan, et al., 2015).

Las cajas se cultivaron durante 24 horas a 37° C y los halos de inhibición que se formaron alrededor de los discos se midieron en mm de diámetro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la zona de inhibición superior a 7 se consideró resultado positivo (Hassan, et al., 2015).

4.2.3.3. Cepa fúngica

La cepa de *Candida albicans*, se obtuvo de la Colección de Levaduras Quito Católica CLQCA del Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa, CNIB de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE).

Cultivada en agar Yeast Malt (YMA) a $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante 48 horas.

4.2.3.4. Ensayo Antifúngico

Se evaluó la actividad antifúngica usando la técnica de difusión en disco en cajas Petri (Hassan, et al., 2015). Los discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro se cargaron con 20 uL de los seis extractos microalgales y se secaron al aire. Adicionalmente se usaron discos que contenían con 20 uL de anfotericina B (30mg/ μL) como control positivo y discos con 20 uL de etanol 95% como control negativo.

Finalmente todos los discos se colocaron en cajas con medio sólido Muller Hinton en las que previamente se inoculó *C. albicans* (Hassan, et al., 2015).

Las cajas se cultivaron durante 48 horas a $24^{\circ}\text{C} \pm 1$ y los halos de inhibición que se formaron alrededor de los discos se midieron en mm de diámetro. Todos los ensayos se realizaron por triplicado y la zona de inhibición superior a 7 se consideró resultado positivo (Hassan, et al., 2015).

4.2.4. Ensayo leishmanicida

El ensayo antileishmania se realizó por triplicado, utilizando una placa de 96 pocillos como se describe en Screen to Nature (Global Institute for Bioexploration, 2014).

4.2.4.1. Cultivo de Leishmania

Para el ensayo leishmanicida se utilizó *Leishmania mexicana* donada por el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas (UDLA). Se cultivaron en medio de avena, durante 48 horas a 24° C, siguiendo el protocolo modificado de modificado de Lara, R., Castro, T., Castro, J y Castro, G. (2007) como se detalla en el ANEXO 15

4.2.4.2. Montaje de placa

Se etiquetó por triplicado la placa de 96 pocillos como se muestra en la figura 3.

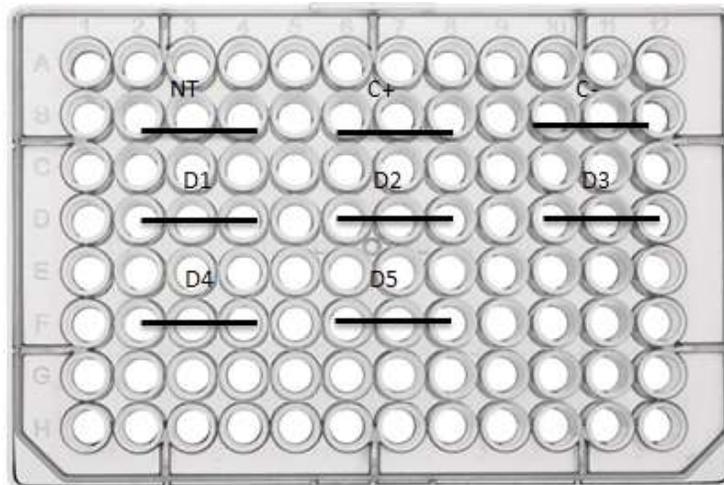


Figura 3. Etiquetado de la placa; NT: no tratamiento; C+: control positivo; C-: control negativo; D1; D2; D3; D4; D5: diferentes diluciones de los extractos microalgales

4.2.4.3. Determinación actividad antileishmania

Para la determinación de la actividad antileishmania, se incubó *Leishmania mexicana* en placas de 96 pocillos durante 48 horas. Como control positivo se

utilizó anfotericina a una concentración de 5% y como control negativo etanol al 95%. Se utilizó el ensayo de MTT modificado para evaluar el efecto de los extractos microalgales sobre la viabilidad de los parásitos (Pereira, et al., 2015).

4.2.4.4. Revelado de la placa

Después del tiempo de incubación se añadió 10 uL de MTT (diluido en PBS) a cada pocillo y se incubó durante 2 horas a 24°C. Posteriormente se traspasó el volumen de cada pocillo a microtubos y se centrifugaron a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 5 minutos. Finalmente, se aspiró el sobrenadante, se añadió 150 uL de DMSO y se traspasó a una nueva placa.

El crecimiento de *Leishmania mexicana*, se midió mediante un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 y 670 nm (Gen 5, Biotek) y los resultados se expresaron en términos de viabilidad celular (Pereira, et al., 2015).

4.2.4.5. Determinación de la viabilidad celular

Para la determinación de la viabilidad celular, los resultados obtenidos de la medición con el espectrofotómetro se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism 6.0, se realizó la prueba de Dunnet para determinar la significancia del valor P y un análisis de varianza ANOVA con un porcentaje de confianza del 95%.

4.2.5. Ensayo nematicida

4.2.5.1. Cultivo de *Panagrellus redivivus*

Para el ensayo nematicida se utilizó *Panagrellus redivivus* donado por el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas (UDLA). Se

cultivaron en medio de avena, durante 48 horas a 24° C, siguiendo el protocolo modificado de modificado de Lara, R., Castro, T., Castro, J y Castro, G. (2007) como se detalla en el ANEXO 15

4.2.5.2. Ensayo

El ensayo nematicida se realizó por triplicado, utilizando una placa de 96 pocillos como se describe en Screen to Nature (Global Institute for Bioexploration, 2014) con modificaciones.

4.2.5.3. Preparación de la placa

Se etiquetó por triplicado la placa de 96 pocillos como se muestra en la figura 4.

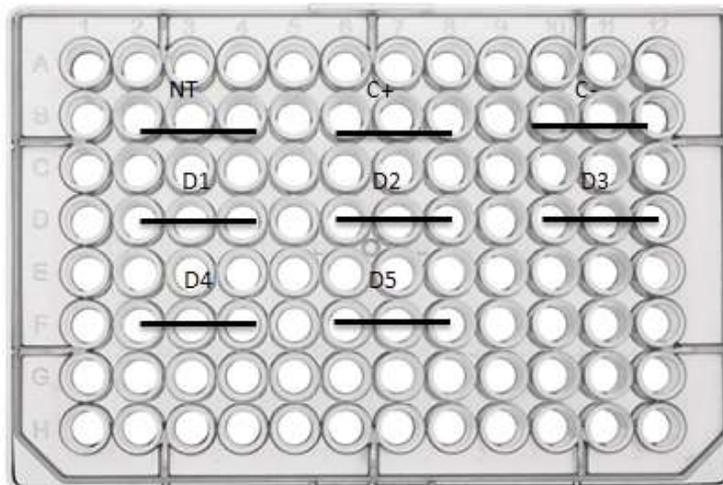


Figura 4. Etiquetado de la placa; NT: no tratamiento; C+: control positivo; C-: control negativo; D1; D2; D3; D4; D5: diferentes diluciones de los extractos microalgales.

4.2.5.4. Montaje de la placa

Se agregó 90 uL de suspensión de nemátodos a cada uno de los pocillos. Adicionalmente se agregó 5 uL de CuSO_4 (160 mg/mL) como control positivo, 5 uL de etanol al 95% como control negativo y 5 uL de las diluciones microalgales. Finalmente se cubrió la placa y se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas (Pereira, et al., 2015).

4.2.5.5. Análisis de la placa

Pasadas las cuatro horas de incubación se observó la placa desde abajo y desde la parte superior. El análisis cualitativo de las placas se realizó con la ayuda de una tabla con ponderaciones según el protocolo de Screen to Nature GIBEX (2014) que se muestra a continuación en la tabla 6 (Graf, Rojas, & Baldeón, 2016):

Tabla 6:

Análisis cualitativo de ensayo nematicida con ponderaciones

Ponderación	Análisis de actividad nematicida
0	Nemátodos vivos tras 4 horas: extracto sin actividad nematicida.
3	Nemátodos muertos en 4 horas o menos: extracto con actividad nematicida.

4.2.6. Ensayo antioxidante

El ensayo antioxidante se realizó por triplicado, utilizando una placa de 96 pocillos de acuerdo con el método Screen to Nature (Global Institute for Bioexploration, 2014).

4.2.6.1. Preparación de la solución ABTS

Se agregó 1 mL de agua y 7 mg de ABTS a un microtubo y se agitó. En otro microtubo se colocó 50 mg de persulfato de potasio $K_2S_2O_8$ y 1 mL de agua destilada, se agitó. Esta solución se etiquetó como 100x persulfato de potasio. Posteriormente se adicionó 20 μ L de la solución 100x de persulfato de potasio a la solución de ABTS. Esta nueva solución se etiquetó como stock de ABTS se cubrió y almacenó para su posterior uso (Graf, et al., 2016)

4.2.6.2. Preparación de la placa

Se etiquetó por triplicado la placa de 96 pocillos como se muestra en la figura 5.

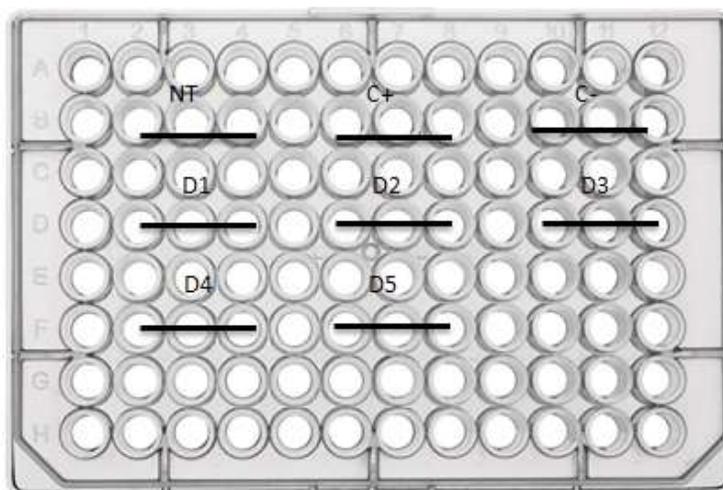


Figura 5. Etiquetado de la placa; NT: no tratamiento; C+: control positivo; C-: control negativo; D1; D2; D3; D4; D5: diferentes diluciones de los extractos microalgales.

4.2.6.3. Montaje de la placa

Después de una hora, se diluyó el stock de ABTS en 20 mL de agua destilada. Se tomó 180 uL de la solución ABTS diluido y se colocó en cada pocillo de la parte superior de la placa. En la parte inferior de la placa se colocó 180 uL de agua destilada autoclavada como patrón de referencia de color para facilitar el análisis de la placa

Adicionalmente se agregó 10 uL de etanol al 95% como control negativo, 10 uL de ácido ascórbico (17,6mg/mL) como control positivo y 10 uL de extracto.

4.2.6.4. Análisis de la placa

Pasados de cinco a diez minutos desde que se agregaron los extractos a la placa, se procedió al análisis de la misma. La solución stock ABTS diluido provocó un cambio de color en los extractos microalgales, de un color verde oscuro a un verde más claro o incoloro (Graf, et al., 2016).

El análisis cualitativo de las placas con los extractos microalgales se realizó con la ayuda de la tabla 7, con ponderaciones según el protocolo de Screen to Nature GIBEX (2014) que se muestra a continuación:

Tabla 7:

Análisis cualitativo de ensayo antioxidante con ponderaciones

Ponderación	Análisis de actividad antioxidante
0	Solución de color verde oscuro: extracto sin actividad antioxidante
1	Solución de color verde: extracto con actividad antioxidante baja
2	Solución de color verde claro: extracto con actividad antioxidante moderada
3	Solución incolora o casi incolora: extracto con actividad antioxidante alta

4.2.7. Ensayo de Citotoxicidad

4.2.7.1. Macrófagos RAW 264.7

Se realizó el cultivo in vitro de los macrófagos RAW 264.7 en medio Dulbeccos Modified Eagle Brunswick (GIBCO) con 10% de FBS y 1% de una solución de penicilina/estreptomina, a 37°C, adicionado 5% de CO₂ y 90% de humedad (Mahmoudvand, Shakibaie, Tvakoli, Jahanbakhsd, & Sharifi, 2014).

4.2.7.2. Ensayo de citotoxicidad de los extractos microalgales en los macrófagos RAW 264.7

La citotoxicidad de los extractos microalgales fue evaluada frente a la línea celular RAW 264.7, mediante el método colorimétrico MTT

Se colocó 90 µL de macrófagos en una placa de 96 pocillos. Adicionalmente se colocó 20 µL de los extractos microalgales en cada pocillo, se utilizó como controles positivos: Podofilotoxina (100 µL/mL), anfotericina (100 µL/mL) y DMSO al 1% (Mahmoudvand, et al., 2014).

Las placas se cultivaron a 37°C durante 24 horas, adicionando 5% de CO₂ y 90% de humedad. Transcurrido este tiempo se colocó 10 µL de MTT diluido en PBS (5mg/mL) y se incubó durante una hora a la misma temperatura. Se centrifugó la placa a 3700 rpm durante 10 minutos, se aspiró el sobrenadante y se adicionó 100 µL de DMSO. Finalmente se leyó las absorbancias de las placa a 570 y 630 nm usando el espectrofotómetro Bio Tek con el programa Gen5 (Mahmoudvand, et al., 2014).

4.2.8. Cálculo de la Concentración Inhibitoria media IC50

Se realizó el cálculo de la Concentración Inhibitoria media IC50, mediante la utilización del método MTT como se muestra en el ANEXO 17. Se sembró 100 μ L de promastigotes (parásito flagelado móvil) en una placa de 96 pocillos. Se utilizó las cinco diluciones de los seis extractos microalgales. Como control positivo se utilizó Anfotericina (100 μ L/mL) y DMSO al 1%. Se incubaron los promastigotes con las diluciones microalgales y los controles a 24°C durante 24 horas, por último se leyó las absorbancias de las placa a 570 y 630 nm usando el espectrofotómetro Bio Tek con el programa Gen5 (Mahmoudvand, et al., 2014).

4.2.9. Análisis estadísticos

Los resultados obtenidos se expresaron como la desviación estándar media (SD). El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante la prueba de Dunnett, se consideró estadísticamente significativo a nivel de $p < 0,05$. Para estos análisis se utilizó el programa informático Excel 2015 y el Programa estadístico Graphpad Prism 6.0, adicionalmente se realizó el análisis de varianza de un factor ANOVA.

5. Capítulo V: Resultados y Discusión

5.1. Ensayo antimicrobiano

Se evaluaron seis extractos etanólicos de cepas microalgales para determinar su potencial antibacteriano y antifúngico frente a dos bacterias (*E. coli* y *S. aureaus*) y una levadura (*C. albicans*).

En la tabla 8 se observó que los extractos microalgales *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* no presentaron potencial

antimicrobiano contra *E. coli*, *S. aureus* y *Candida albicans*. Únicamente el extracto Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* mostró una actividad antimicrobiana moderada contra *S. aureus* (7,2 mm de diámetro de halo de inhibición).

Tabla 8:

Actividad antimicrobiana de seis extractos microalgales frente a microorganismos patógenos modelo

Extractos microalgales	Inhibición del crecimiento expresada como diámetro de la zona de inhibición (mm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Chlorella</i>	-	-	-
Consorcio <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	-	7,2	-
<i>Chlorococcum</i>	-	-	-
<i>Chlorococcus</i>	-	-	-
<i>Scenedesmus</i>	-	-	-
<i>Synechococcus</i>	-	-	-

Se determinó que los extractos etanólicos *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* de cepas microalgales no mostraron actividad antibacteriana, mientras que el extracto Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* demostró actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, lo cual concuerda con Prakash et al., (2011), cuyo estudio demostró que los extractos etanólicos provenientes de especies de algas marinas mostraban más eficacia antibacteriana que las especies de agua dulce, cabe mencionar que los extractos *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Synechococcus*, *Scenedesmus* y el Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, fueron realizados a partir de especies de agua dulce lo que supondría su poca actividad antimicrobiana.

Prasanna et al., (2008) y Vijayakumar et al., (2011) mostraron al etanol, metanol y acetona como buenos solventes para la extracción de compuestos antibacterianos

y antifúngicos a partir de cepas de microalgas marinas. Shimna (2012) igualmente estudiando la actividad antimicrobiana de microalgas sugirió que los extractos microalgales preparados con cloroformo como solvente mostraron buenos resultados en la extracción de compuestos antimicrobianos.

Aunque en Hassan et al., (2015) los extractos etanólicos son más eficaces que los extractos metanólicos y los preparados con cloroformo, los extractos de las cepas *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Synechococcus*, *Scenedesmus* y Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, fueron preparadas con etanol como solvente pero no se obtuvo resultados que permitan usarlos como potenciales antimicrobianos.

El extracto del Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* presentó actividad antimicrobiana demostrando así la presencia de componentes antibacterianos. Los resultados del antibiograma del extracto Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* fueron compatibles con el estudio de Prakash et al., (2011) que realizó extractos etanólicos de *Chlorella* sp. En consorcios con microalgas de agua dulce, mostrando una clara actividad antibacteriana contra bacterias y hongos especialmente *Bacillus subtilis* y *S. aureus*. Siendo estos consorcios los más efectivos contra las bacterias mostrando zonas de inhibición mayores a 7 mm. Lo cual se asemeja al resultado obtenido en este trabajo de titulación en el cual el extracto Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* formada por un consorcio microalgal de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. donde se obtuvo una zona de inhibición de 7,2 mm como resultado del antibiograma.

Estudios realizados por Najdenski, et al., (2013) demostraron que los compuestos antibacterianos presentes en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. pueden ser pigmentos y ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga de *Scenedesmus obliquus* presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, así como los ácidos eicosapentaenoico (EPA), palmitoleico (AP) presentes en *Chlorella* sp.

Falaise, et al., (2016) describió la importancia de los ácidos grasos como componentes antibacterianos actuando sobre la pared celular bacteriana causando una reducción en la ingesta de nutrientes y una reducción de la respiración celular, lo que conllevó a la muerte celular.

5.2. Ensayo nematocida

Se evaluaron seis extractos etanólicos microalgales para determinar su potencial nematocida frente a *P. redivivus*.

En tabla 9 se muestra que los extractos *Chlorrella*, consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* no presentaron potencial nematocida.

Tabla 9:

Actividad nematocida de seis extractos microalgales frente a P. redivivus

Inhibición de crecimiento de <i>P. redivivus</i> expresada en valores 0 y 3	
Extractos microalgales	Ponderación
<i>Chlorrella</i>	0
Consortio <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	0
<i>Chlorococcum</i>	0
<i>Chlorococcus</i>	0
<i>Scenedesmus</i>	0
<i>Synechococcus</i>	0

Los resultados obtenidos demostraron que las cepas *Chlorrella*, consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* no presentaron actividad nematocida frente a *C. elegans*,

transcurridas las horas de incubación de *P. redivivus* conjuntamente con los extractos microalgales la actividad nematocida de los extractos fue nula.

Estos resultados confirmaron la presencia de compuestos bioactivos que podrían ser usados por los nemátodos como fuente de energía. Ferreira, et al., (2011) confirmó que los nemátodos de agua dulce se alimentan de microalgas debido a su contenido de pigmentos y materiales fotosintéticos.

También se demostró que el etanol como solvente para la realización de los extractos de consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* no interfirió con el crecimiento y motilidad de los nemátodos. Katiki, et al., (2011) identificó que solventes como etanol, cloroformo, metanol, tween 20, tween 80 en concentraciones que varían entre el 1 a 5 % de pureza no interfieren en la motilidad de los nemátodos cuando son cultivados in vitro.

5.3. Ensayo antioxidante

Se evaluaron seis extractos etanólicos microalgales para determinar su potencial antioxidante.

En la tabla 10 se muestra que los extractos *Chlorrella*, *Synechococcus* y *Scenedesmus* presentaron potencial antioxidante moderado de acuerdo a la tabla de ponderación del manual Screen To Nature (Global Institute for Bioexploration, 2014).

Tabla 10:

Actividad antioxidante de seis extractos microalgales.

Actividad antioxidante de extractos microalgales expresada en valores 0 y 3	
Extractos microalgales	Ponderación
<i>Chlorrella</i>	2
Consortio <i>Chlorrella</i> y <i>Scenedesmus</i>	0
<i>Chlorococcum</i>	0
<i>Chlorococcus</i>	0
<i>Scenedesmus</i>	2
<i>Synechococcus</i>	2

En la realización del ensayo antioxidante se evaluaron los extractos microalgales *Chlorella*, consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* y se determinó que los extractos *Chlorrella*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* poseen actividad antioxidante moderada.

Goirisy colaboradores (2011), evaluaron extractos microalgales de 32 muestras de la biomasa de microalgas de agua dulce entre ellas *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Phaeodactylum* sp., *Nannochloropsis* sp. *Isochrysis* sp. mediante el ensayo del reactivo ABTS, corroborando la presencia de compuestos antioxidantes en los extractos etanólicos y metanólicos microalgales evaluados. Los resultados fueron comparables a los obtenidos en este ensayo debido a que se usó etanol como solvente y se obtuvieron tres extractos con actividad antioxidante moderada.

Adicionalmente, los resultados obtenidos en este ensayo fueron comparables con los estudios previos de Geethay colaboradores (2010) en donde se obtuvieron extractos microalgales con niveles más altos de antioxidantes debido al uso del etanol al 90% como solvente de dichos compuestos.

El uso del reactivo ABTS en este ensayo permitió la separación de compuestos antioxidantes de los extractos de las cepas microalgales *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* lo cual concordó con los resultados obtenidos por Cha, et al., (2010) en dicho estudio se utilizó ABTS para la separación de compuestos antioxidantes (carotenoides y clorofilas) de la biomasa de microalgas

Kovacik, Klejdus y Backor, (2010) realizaron una investigación para determinar compuestos antioxidantes en microalgas, descubriendo que las microalgas son capaces de sintetizar compuestos fenólicos que se usan como mecanismos de defensa cuando son expuestas a estrés.

5.4. Ensayo leishmanicida

Se evaluaron seis extractos etanólicos de cepas microalgales para determinar su potencial leishmanicida frente a *Leishmania mexicana*.

5.4.1. Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus*.

La tabla 11 del ANOVA muestra un valor significativo de $P=0,0002$ entre los tratamientos, es decir existe no existe diferencia entre los tratamientos probados.

Tabla 11:

Tabla de Análisis de varianza o ANOVA de la actividad leishmanicida de la Consorcio Chlorrella y Scenedesmus.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P valor
Tratamientos	36862	7	5266	F (1,85, 3,699) = 215,2	P=0,0002
Residual (random)	342,6	14	24,47		
Total	37293	23			

Nota: SS suma de cuadrados; DF grados de libertad; MS cuadrado medio; F distribución F; P valor de P.

Adicionalmente en la figura 6 se observó el porcentaje de viabilidad del *Consortio Chlorrella y Scenedesmus* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D3, D4, D5 las que más variaron, es decir son estadísticamente no significativas

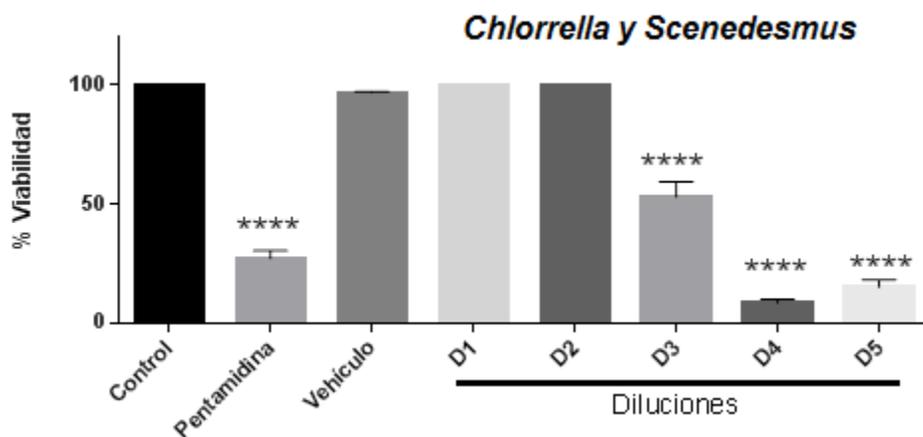


Figura 6. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.4.2. Chlorrella

En la tabla 12 se observó los resultados del ANOVA para la cepa Chlorrella, el análisis de varianza indicó un valor significativo de $P = 0,0025$, no hay diferencia entre los tratamientos.

Tabla 12:

Tabla ANOVA de la actividad leishmanicida de Chlorrella.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	23925	7	3418	F (1,143, 2,286) = 224,9	P=0,0025
Residual (random)	212,7	14	15,19		
Total	24161	23			

Adicionalmente en la figura 7. se observó el porcentaje de viabilidad de la cepa *Chlorrella* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D2, D3, D4, D5 las que más variaron, es decir son estadísticamente no significativas

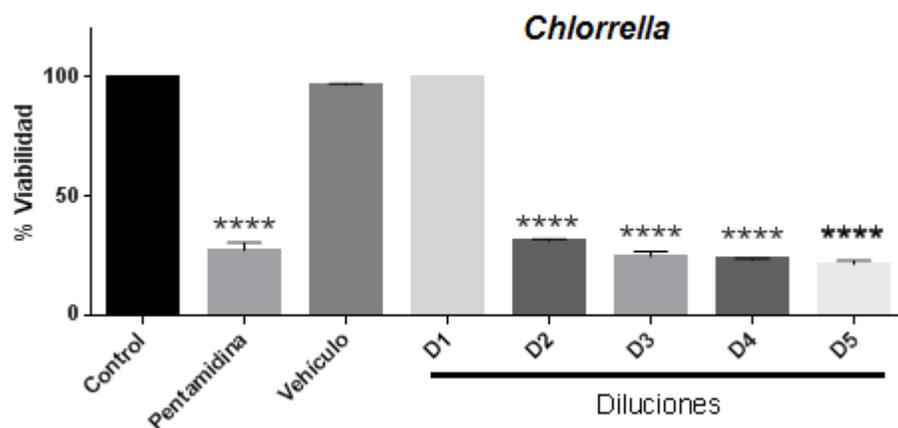


Figura 7. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.4.3. *Chlorococcum*

Se observó los resultados de *Chlorococcum* en la Tabla 13 del ANOVA, el análisis de varianza indicó un valor significativo de $P=0,0001$, los tratamientos no varían.

Tabla 13:

Tabla ANOVA de la actividad leishmanicida de *Chlorococcum*.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	26137	7	3734	F (1,843, 3,687) = 235,1	P=0,0001
Residual (random)	222,3	14	15,88		
Total	26441	23			

Adicionalmente en la figura 8 se observó el porcentaje de viabilidad de *Chlorococcum* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D2, D3, D4, D5 las que más variaron, es decir son estadísticamente no significativas

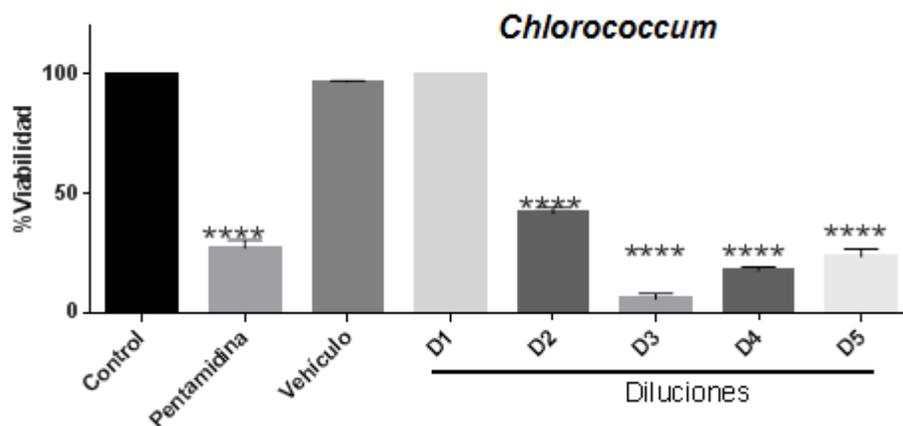


Figura 8. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.4.4. *Chlorococcus*

Se observó los resultados del ANOVA en la tabla 14, cuyos valores de P fueron los siguientes: $P < 0,0001$ para los tratamientos que no muestran diferencia significativa.

Tabla 14:

Tabla ANOVA de la actividad leishmanicida de la cepa *Chlorococcus*.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	35921	7	5132	F (1,749, 3,498) = 1113	$P < 0,0001$
Residual (random)	64,56	14	4,611		
Total	35990	23			

Adicionalmente en la figura 9 se observó el porcentaje de viabilidad de la cepa *Chlorococcus* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D2, D3, D4, D5 las que más variaron, es decir son estadísticamente no significativas

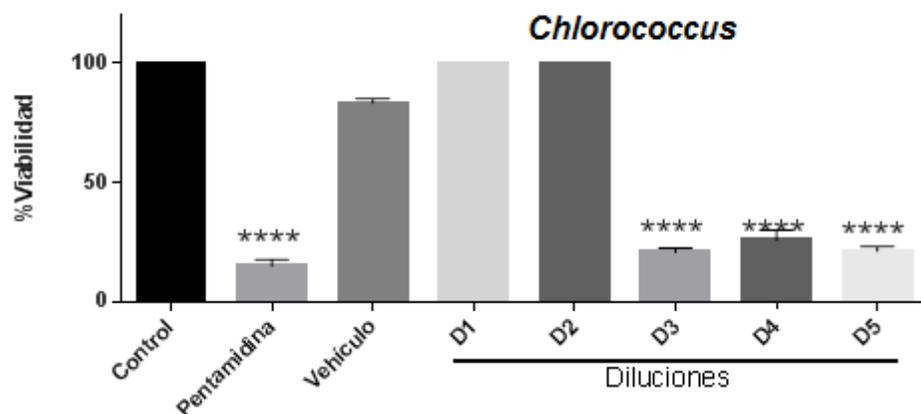


Figura 9. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.4.5. *Scenedesmus*

La Tabla 15 del ANOVA indicó un valor de $P=0,0003$, significativo para los tratamientos.

Tabla 15:

Tabla ANOVA de la actividad leishmanicida de *Scenedesmus*.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	26205	7	3744	F (1,511, 3,023) = 345,2	P=0,0003
Residual (random)	151,8	14	10,85		
Total	26438	23			

Adicionalmente en la figura 10 se observó el porcentaje de viabilidad de la cepa *Scenedesmus* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D2, D3, D4, D5 las que más variaron, es decir son estadísticamente no significativas.

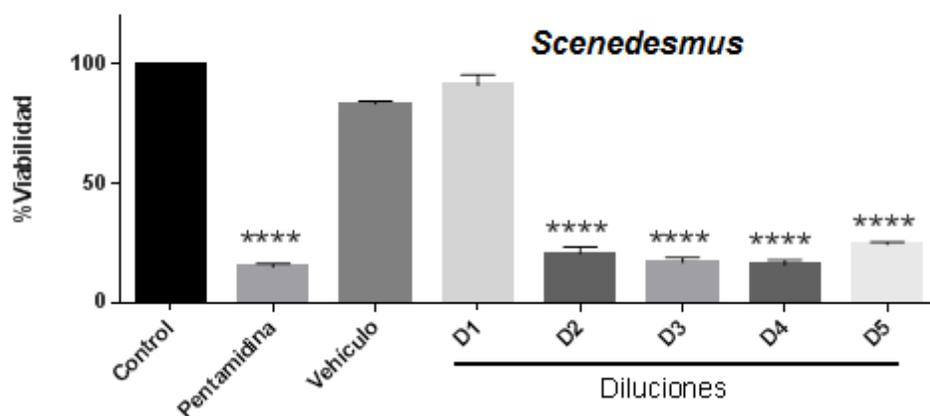


Figura 10. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.4.6. *Synechococcus*

Se observó los resultados de la cepa *Synechococcus* en la Tabla 16 el ANOVA indicó un valor significativo de $P=0,0002$ entre los tratamientos.

Tabla 16:

Tabla ANOVA de la actividad leishmanicida de *Synechococcus*.

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	28689	7	4098	F (1,379, 2,757) = 777,5	P=0,0002
Residual (random)	73,8	14	5,271		
Total	28765	23			

Adicionalmente en la figura 11 se muestra el porcentaje de viabilidad de *Synechococcus* frente a *Leishmania mexicana*, siendo las diluciones D2, D3, D4, D5 estadísticamente no significativas

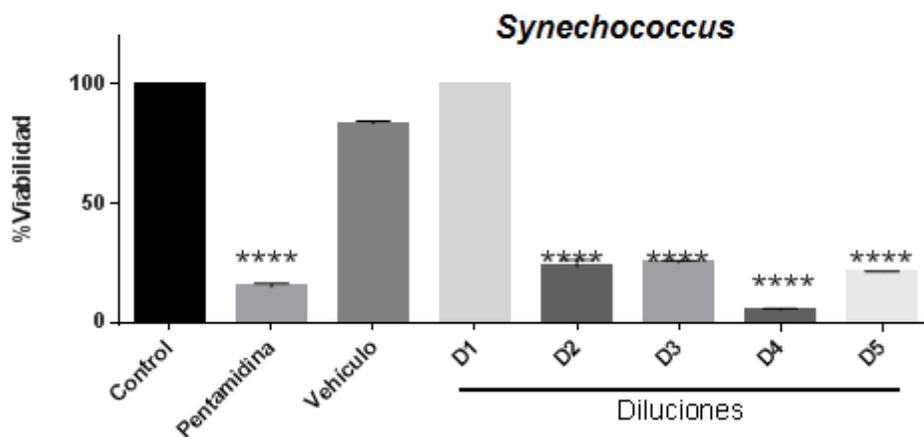


Figura 11. Porcentaje de viabilidad frente a *L. mexicana*. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

De los resultados del presente proyecto de titulación se determinó que los extractos etanólicos como el consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* de cepas microalgales mostraron actividad leishmanicida, Lo cual concuerda con Freire, Robledo, Chan, Ortega. (2011), cuyo trabajo demostró que los extractos microalgales presentan eficacia contra *L. mexicana*.

Sanmukh y colaboradores (2014) utilizaron acetato de etanol y metanol como solventes para la extracción de compuestos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiprotozoario y antiplasmódico a partir de cepas de microalgas marinas.

Según Pereiray colaboradores (2015) a partir de extractos metanólicos de microalgas se puede contrarrestar una infección por leishmania coincidiendo con el presente trabajo en el que se demostró que las cepas *Chlorella* y *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* tienen potencial leishmanicida.

Varios estudios realizados con la metodología MTT revelan resultados óptimos contra varias cepas de Leishmania como menciona Carneiro y colaboradores 2015 corroborando con este estudio en el cual se utilizó la metodología del MTT con modificaciones.

5.5. Ensayo de citotoxicidad

Se evaluaron seis extractos etanólicos de cepas microalgales para determinar su potencial citotóxica frente a RAW 264.7.

5.5.1. Chlorrella y Scenedesmus

Se observó los resultados del consorcio Chlorrella y Scenedesmus en la Tabla 17, el ANOVA indicó un valor significativo de $P=0,0004$ entre los tratamientos.

Tabla 17:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica del consorcio Chlorrella y Scenedesmus

ANOVA	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Tratamientos	24698	7	3528	F (1,372, 2,744) = 426,2	P=0,0004
Residual (random)	115,9	14	8,278		
Total	24823	23			

Adicionalmente en la figura 12 se observó el porcentaje de viabilidad del consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* frente a su actividad citotóxica.

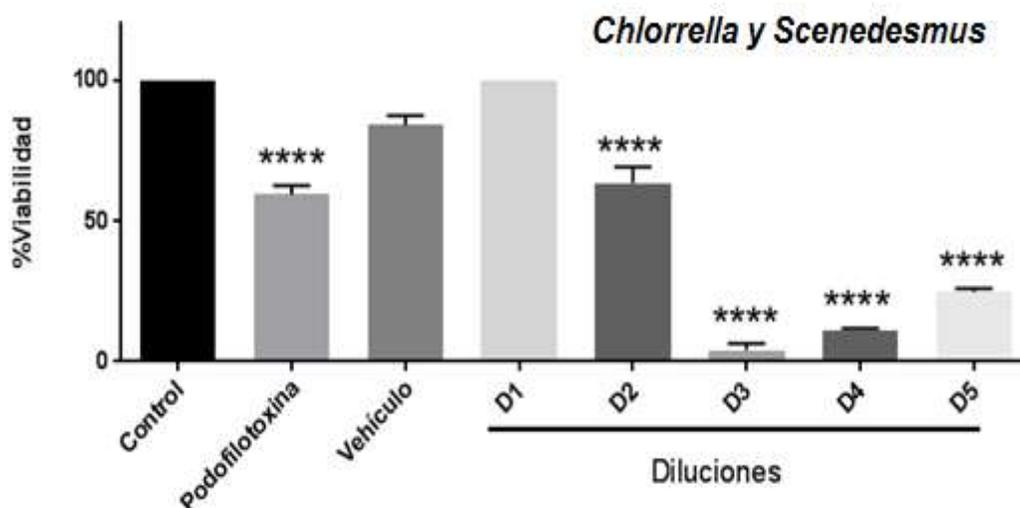


Figura 12. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM **** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.2. *Chlorrella*

La tabla 18 del ANOVA indicó un valor de $P=0,0002$ entre los tratamientos.

Tabla 18:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica de *Chlorrella*.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	19277	7	2754	F (7, 10) = 101,7	P=0,0002
Residual (within columns)	270,7	10	27,07		
Total	19547	17			

En la figura 13 se observó que los tratamientos son no significativos entre sí, juntamente con los controles

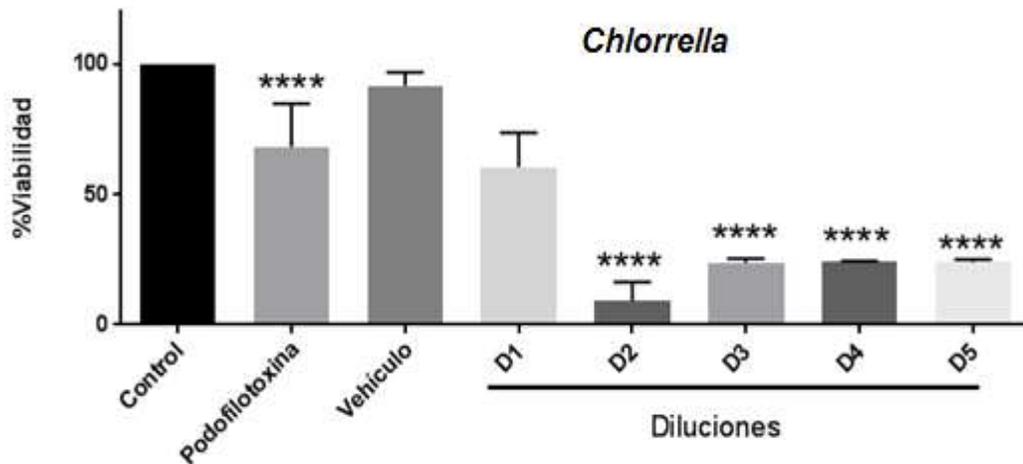


Figura 13. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.3. *Chlorococcum*

Se observó los resultados de *Chlorococcum* en la tabla 19 del ANOVA se indicó un valor significativo de $P < 0,001$ entre los tratamientos.

Tabla 19:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica de *Chlorococcum*.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	19277	7	2754	F (7, 10) = 101,7	$P < 0,0001$
Residual (within columns)	270,7	10	27,07		
Total	19547	17			

En la figura 14 se observó que los tratamientos son no significativos entre sí, juntamente con los controles

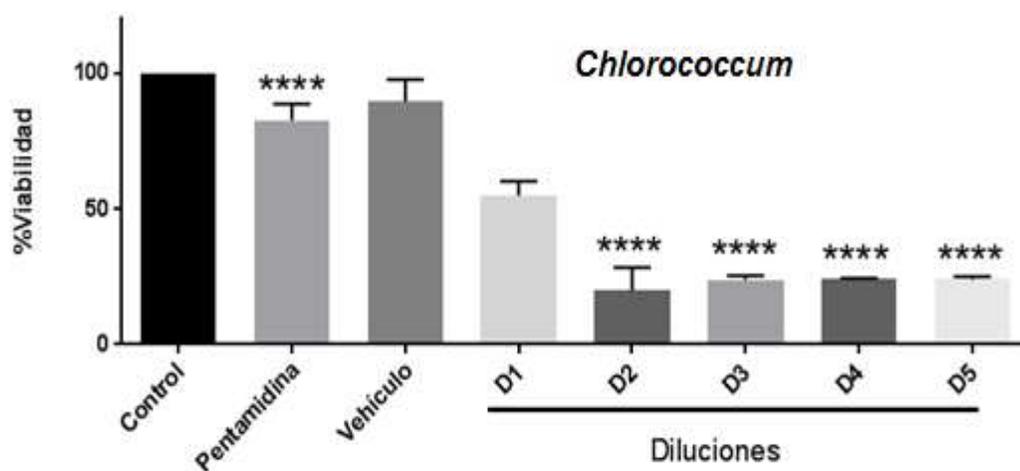


Figura 14. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM **** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.4. *Chlorococcus*

Se observó los resultados de *Chlorococcus* en la Tabla 20, el ANOVA indicó un valor de $P < 0,001$ entre los tratamientos.

Tabla 20:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica de *Chlorococcus*.

ANOVA table	SS	F	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	18565	7	2652	F (7, 12) = 81,94	$P < 0,0001$
Residual (within columns)	388,4	12	32,36		
Total	18953	19			

Se observó en la figura 15 que los tratamientos son no significativos entre sí, juntamente con los controles

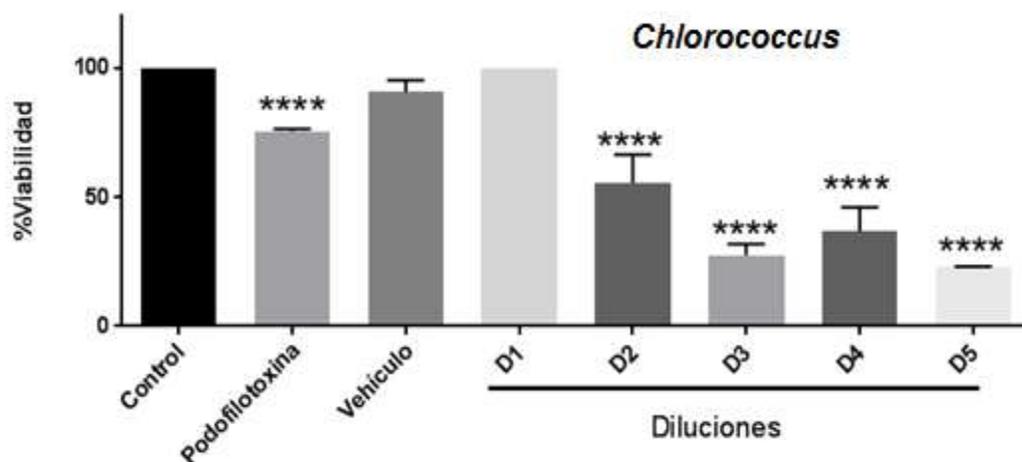


Figura 15. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.5. Scenedesmus

Se observó los resultados de *Scenedesmus* en la Tabla 21, el ANOVA indicó un valor significativo de $P < 0,001$ entre los tratamientos.

Tabla 21:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica de Scenedesmus.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	15589	7	2227	F (7, 9) = 78,25	P<0,0001
Residual (within columns)	256,1	9	28,46		
Total	15845	16			

Se observó en la figura 16 que los tratamientos son no significativos entre sí, juntamente con los controles

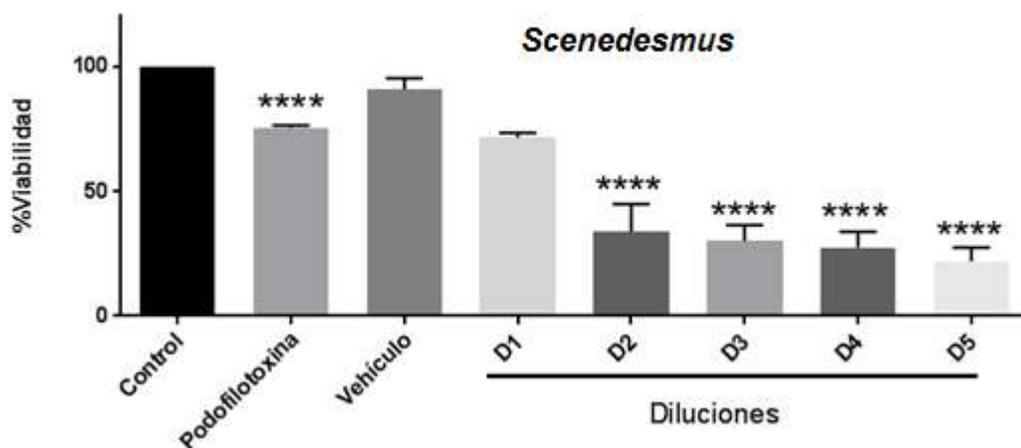


Figura 16. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.6. *Synechococcus*

Se observó los resultados de *Synechococcus* en la Tabla 22, el ANOVA indicó un valor de $P < 0,001$ entre los tratamientos.

Tabla 22:

Tabla ANOVA de la actividad citotóxica de *Synechococcus*.

ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	17927	7	2561	F (7, 9) = 74,97	$P < 0,0001$
Residual (within columns)	307,4	9	34,16		
Total	18234	16			

Se observó en la figura 17 que los tratamientos son no significativos entre sí, juntamente con los controles

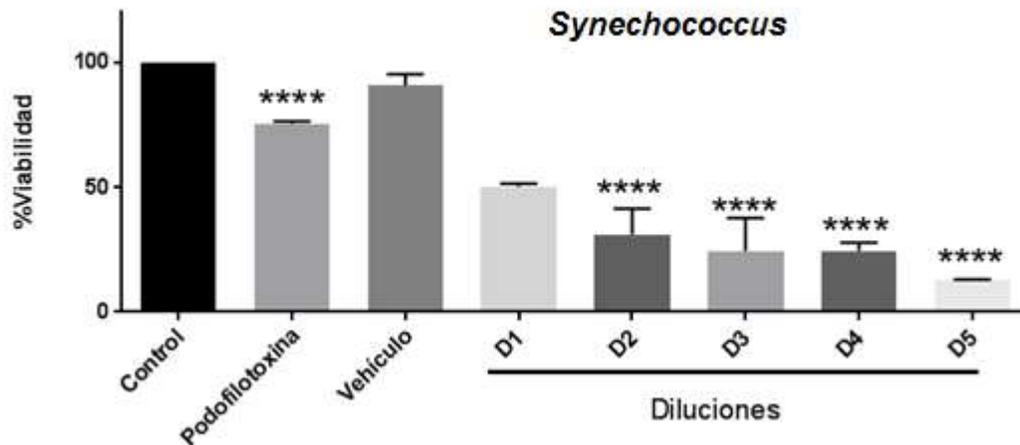


Figura 17. Porcentaje de viabilidad usando RAW 267.4. Las barras representan el promedio de 3 experimentos con SEM *** representa $p > 0.001$. D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5.

5.5.7. Cálculo de la Concentración Inhibitoria Mínima IC50

Se observó los resultados del cálculo del IC50 para todos los extractos mostrando en la figura 18 se muestra el porcentaje de inhibición, la concentración inhibitoria mínima expresada en Log [u/mL] de la concentración de los extractos microalgales.

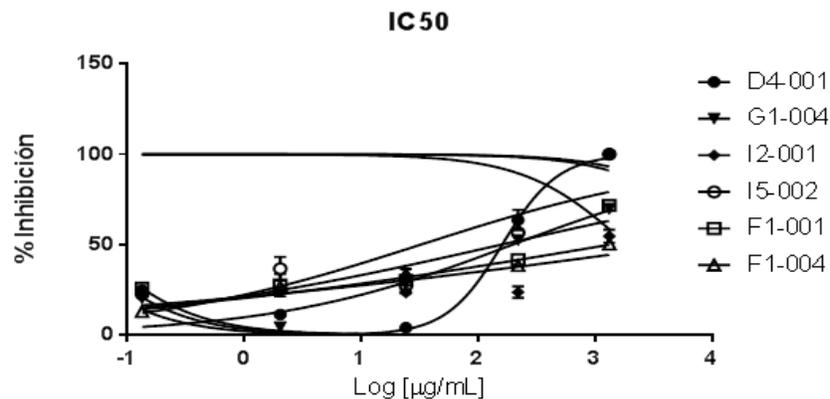


Figura 18. Porcentaje de inhibición de microalgas en las células RAW 264.7 del IC50 para todos los extractos microalgales

Los extractos etanólicos como son: consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* de cepas microalgales mostraron actividad de toxicidad frente a RAW264.7.

Según Santoso y colaboradores 2014 la ingesta de microalgas es limitada debido a la seguridad alimentaria para el consumidor, y las que se encuentran en el mercado son *Chlorella*, *Spirulina* y *Dunaliella*. Para conocer sobre la posible toxicidad de las cepas y consorcios utilizados en esta investigación se determinó su posible citotoxicidad.

Estas pruebas de citotoxicidad son importantes para la seguridad alimentaria de seres humanos y animales debido a que algunas especies de microalgas tanto marinas como de agua dulce pueden contener: saxitoxina, brevetoxina, ácido okadaico, ácido domoico, palitoxina, etc como mencionan Delia y colaboradores (2015). Debido a esto es necesario un análisis molecular y químico de consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* para determinar que moléculas o metabolitos secundarios producen dichas cepas microalgales.

5.5.8. Resultados globales

Los resultados obtenidos por el ensayo antihelmíntico y antifúngico fueron nulo. Para el ensayo antibacteriano resultó nulo para *E. coli*; en cambio para el ensayo antibacteriano contra *S. aureus* se obtuvo un halo de inhibición de 7,2mm. Los resultados obtenidos en los ensayos: antioxidante y leishmanicida fueron moderado.

A continuación en la Tabla 23 se indican los resultados globales de las diferentes experimentaciones realizadas en esta investigación.

Además en la Tabla 24 se encuentra la significancia de las ponderaciones creadas en la Tabla 23

Tabla 23

Tabla de resultados globales de las diferentes experimentaciones realizadas (antibacteriano, antifúngico, antioxidante, nematocida y leishmanicida).

GENERO	ENSAYOS				
	Antibacteriano (halo de inhibición en mm)	Antifúngico (halo de inhibición en mm)	Antioxidante	Nematocida	Leishmanicida
Consortio <i>Chlorrella</i> + <i>Scenedesmus</i>	7,2 mm (<i>S. aureus</i>)	0	0	0	2
<i>Chlorella</i>	0 (<i>E. coli</i>)	0	2	0	2
<i>Scenedesmus</i>	0 (<i>E. coli</i>)	0	2	0	2
<i>Synechococcus</i>	0 (<i>E. coli</i>)	0	2	0	2
<i>Chlorococcum</i>	0 (<i>E. coli</i>)	0	0	0	2
<i>Chlorococcus</i>	0 (<i>E. coli</i>)	0	0	0	2

Tabla 24

Análisis cuantitativo de las ponderaciones de cada ensayo

Ponderación	Análisis cuantitativo
0	Actividad nula
1	Actividad baja
2	Actividad moderada
3	Actividad alta

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Del presente trabajo de titulación se concluye que los extractos microalgales *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus*, *Synechococcus* y consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* mostraron algún tipo de actividad biológica.

Los extractos de las cepas *Chlorrella*, *Chlorococcum*, *Chlorococcus*, *Scenedesmus* y F1-004 no mostraron potencial antimicrobiano contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*. El Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* mostró actividad antimicrobiana moderada contra *S. aureus* formando un halo de inhibición de 7,2 mm.

De los extractos usados en este proyecto de titulación ninguno presentó actividad nematocida, al contrario promovieron el crecimiento de los nemátodos *P. redivivus*

Los extractos *Chlorrella*, *Scenedesmus* y *Synechococcus* presentan capacidad antioxidante al evaluarse su actividad antioxidante usando el reactivo ABTS.

Las cepas de microalgas analizadas como leishmanicida promueven una alternativa de tratamiento para la leishmaniasis pero se deben realizar estudios específicos para la determinación de las sustancias bioactivas con potencial leishmanicida.

Los extractos microalgales presentó una leve toxicidad a ninguna de las concentraciones a las que se evaluó frente a la RAW 264.7

6.2. Recomendaciones

Para obtener la biomasa de las diferentes cepas de microalgas es necesario realizar el cultivo inicial con un volumen inicial de 5 litros hasta llegar a un volumen final de 50 litros, esto en terrenos que no interfieran con el sector agrícola.

Realizar una evaluación del solvente usado para la preparación de los extractos para determinar si interfiere o no con el crecimiento de los microorganismos patógenos empleados para cada ensayo, como control negativo en cada ensayo.

Para futuras investigaciones realizar los extractos utilizando diferentes solventes como acetona, metanol y acetato de etilo para determinar cuál de ellos es más eficiente para la extracción de compuestos bioactivos microalgales, puesto que solo se utilizó etanol y no se pudo determinar qué tan eficiente es como solvente.

Profundizar en los ensayos leishmanicida y antioxidante para futuras investigaciones debido a que presentan una actividad moderada.

Realizar una investigación molecular de todas microalgas para establecer su identificación molecular y determinar los diferentes metabolitos que producen.

REFERENCIAS

- Agudo, L. (2010). Técnicas para la determinación de compuestos antioxidantes en alimentos. *Revista de la educación en Extremadura* , 1-8. Recuperado el 16 de septiembre de 2016 de http://www.anpebadajoz.es/autodidacta/autodidacta_archivos/numero_9_archivos/l_a_medina.pdf
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votypka, J., Marty, P., Delaunay, & P. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *The PLOS Neglected Tropical Diseases Staff*. Recuperado el 20 de agosto del 2016 de <http://journals.plos.org/plosntds/article/file?id=10.1371/journal.pntd.0004770&type=printable>
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Iorio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6235-6254. Recuperado el 2 de agosto de 2016 de <http://www.mdpi.com/1660-4601/10/12/6235/htm>
- Andersen, R. (2005). Historical Review of Algal Culturing Techniques. En R. Andersen, *Algal Culturing Techniques*. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj686mgrrSAhXLSSYKHXCVA5gQFggdMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D5586b0815dbbbdb49c8b45af%26assetKey%3DAS%253A273799340068866%25401442290257621&usg=AFQjCNEPfeo00OpYcXKBhGEad0zxcrOwDg&sig2=JvJ8z5SVNkxx2Ca0ZAAMEA>.
- Bañuls, A., Hide, M., & Prugnotte, F. (2007). Leishmania and the Leishmaniases:

- A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *ADVANCES IN PARASITOLOGY*, 1-113. Recuperado el 12 de octubre de 2016 de https://www.mivegec.ird.fr/images/stories/PDF_files/0013.pdf
- Barsanti, L., & Gualteri, P. (2006). Nutrition. En L. Barsanti, & P. Gualteri, *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology* (pág. 7). Taylor y Francis Group. Recuperado el 4 de julio de 2016 de <https://www.crcpress.com/Algae-Anatomy-Biochemistry-and-Biotechnology/Barsanti-Gualtieri/p/book/9780849314674>
- Belinger, E., & Sigeo, D. (2010). Introduction to Freshwater Algae. En E. Belinger, & D. Sigeo, *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators* (Primera ed., págs. 1-40). EEUU: John Wiley and Sons, Ltd. Recuperado el 18 de agosto de 2016 de https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiLkrX5grrSAhWDZiYKHatC_gQFggIMAE&url=https%3A%2F%2Ffaculty.psau.edu.sa%2Ffiledownload%2Fdoc-4-pdf-9fb640ea6abe0e849c8c1fd6eea97c22-original.pdf&usg=AFQjCNEVY02J8mWe4IBwTr19pbi_ak8_bg&sig2=daUT_qcMgPuMoEQ681_fNA
- Berg, H. (2004). Why E. coli. En H. Berg, *E. coli in motion* (págs. 1-6). Springer. Recuperado el 6 de octubre del 2016 de https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwimmcaXg7rSAhVLMYKHXEVAtMQFggiMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2FproductFlyer_978-0-387-00888-2.pdf%3FSGWID%3D0-0-1297-10109581-0&usg=AFQjCNE55evpcjUv9YxpWbtqkBQ71HraXQ&sig2=GfOlkvYGonNAvMCxUAxfYg
- Berzunza, M., Rodríguez, Á., Gutiérrez, G., González, C., Stephens, C., Hidalgo, M., Becker, I. (2015). Leishmania (L.) mexicana Infected Bats in Mexico: Novel Potential Reservoirs. *Plos Neglected Tropical Diseases*,

1-15. Recuperado el 2 de octubre de 2016 de <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003438>

- Bhagavathy, S., Sumathi, P., & Jancy, S. (2011). Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1-7. Recuperado el 5 de octubre de 2016 de <http://apjtb.com/zz/2011S1/1.pdf>
- Bhatia, A., & Zahoor, S. (2007). Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 188-197. Recuperado el 20 de agosto de 2016 de http://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?id=85
- Brown, A., Leech, J., Rogers, T., & McLoughlin, R. (2014). Staphylococcus aureus colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design. *Frontier in Immunology*, 1-20. Recuperado el 20 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24409186>
- Buxbaum, L. (2013). Leishmania mexicana Infection Induces IgG to Parasite Surface Glycoinositol Phospholipids that Can Induce IL- 10 in Mice and Humans. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 1-12. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <http://journals.plos.org/plosntds/>
- Carneiro, L., Paula, J., Sierra, G., Rodriguez, M., Greiller, P., & Salmen, L. (2010). Investigation of plant extract in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeast. *Journal of Ethnopharmacology*, 116-121. Recuperado el 8 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600775>
- Catalán, M., & Montejó, J. (2006). Antifúngicos sistémicos: Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista Iberoamericana de Micología*, 39-49. Recuperado el 13 de octubre de 2016 de <http://www.reviberoammicol.com/2006-23/039049.pdf>

- Christensen, A., Mc Lauchlan, C., Dolbecq, A., Mialane, P., & Jones, M. (2016). Studies of the Effectiveness of Bisphosphonate and Vanadium Bisphosphonate Compounds in vitro against Axenic *Leishmania tarantolae*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-12. Recuperado el 15 de agosto de 2016 de <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/9025627/abs>
- Cuellar, S., Aguilar, I., Cardenas, D., Ornelaas, N., ROmero, M., & Parra, R. (s.f.). Extraction and purification of high-value metabolites . Recuperado el 7 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223877>
- Cuellar, S., Aguilar, I., Cardenas, D., Ornelas, N., Romero, M., & Parra, R. (2014). Extraction and purification of high value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 190-209. Recuperado el 7 de agosto de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25223877>
- Danyal, A., Mubeen, U., & Malik, K. (2013). Investigating two native algal species to determine antibiotic susceptibility against some pathogens. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 70-74. Recuperado el 4 de octubre de 2016 de <https://www.omicsonline.org/open-access/bioactive-compounds-derived-from-microalgae-showing-antimicrobial-activities-2155-9546.1000224.php?aid=27033>
- Delia, A., Caruso, G., Melcarne, L., Caruso, G., Parisini, S., & Lagana, P. (2015). Biological toxins from marine and freshwater microalgae. *Microbial Toxins and related contamination in the Food Industry, Chemistry of Foods*. Recuperado el 4 de octubre de 2016 de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj44ILGhbrSAhVFxCYKHf9yCBkQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.springer.com%2Fcontent%2Fdocument%2Fdocument%2Fdownloadaddocument%2F9783319205588-c2.pdf%3FSGWID%3D0-0-45->

151524p177529826&usg=AFQjCNG3qTgxSa2bAmjNqZA6GgiDhdAY
1Q&sig2=ssc6y1B8tRr2_RRLumOixg

- Fernandez, E., Rangel, C., Espinosa, V., Carillo, K., & Salazar, N. (2012). Disease Severity in Patients Infected with *Leishmania mexicana* Relates to IL -1b. *Plos one Tropical Diseases*. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001533>
- Ferreira, S., Oliviera, T., Bueno, L., Araújo, J., Casatanheira, D., & Toshio, R. (2015). A New Methodology for Evaluation of Nematode Viability. *BioMed Research International*, 1-7. Recuperado el 15 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4383492/>
- Fourie, R., Ells, R., Swart, C., Sebolai, O., Albertyn, J., & Pohl, C. (2016). *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids. *Frontiers in Physiology*, 1-15. Recuperado el 12 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4767902/>
- Freijó, D., Tiburcio, R., Ampuero, M., Brodskyn, C., & Tavares, N. (2015). Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. *Journal of Immunology*. recuperado el 20 de octubre de 2016 de <https://www.hindawi.com/journals/jir/2016/3967436/>
- Freile, Y., Robledo, D., Chan, M., & Ortega, B. (2008). Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia*, 374-377. Recuperado el 20 de octubre de 2016 de <http://www.mda.cinvestav.mx/personaldelmar/images/drafreile/BIOTECNOLOGIA/COMPUESTOS%20BIOACTIVOS%20MARINOS/Freile-Pelegrin%20et%20al%202008.pdf>
- Geetha, B., Navasakthi, R., & Padmini, E. (2010). Investigation of Antioxidant Capacity and Phytochemical Composition of Sun Chlorella An Invitro

- Study. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 1-7. Recuperado el 28 de octubre de 2016 de <https://www.omicsonline.org/investigation-of-antioxidant-capacity-and-phytochemical-composition-of-sun-chlorella-an-in-vitro-study-2155-9546.1000104.php?aid=1518>
- Gleiznys, A., Zdanaviciene, E., & Zilinskas, J. (2015). Candida albicans importance to denture wearers. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 54-66. Recuperado el 22 de octubre de 2016 de <http://www.sbdmj.com/152/152-04.pdf>
- Global Institute for Bioexploration. (2014). Manual GIBEX Screens to Nature-Resumen. 1-26. Recuperado el 22 de octubre de 2016 de <http://www.gibex.org/>
- Graf, B., Rojas, P., & Baldeón, M. (2016). Discovering the Pharmacological Potential of Ecuadorian Market Plants using a Screens-to-Nature Participatory Approach. *Journal of Biodiversity, Bioprospecting and Development*, 1-9. recuperado el 8 de noviembre de 2016 de <https://www.omicsgroup.org/journals/discovering-the-pharmacological-potential-of-ecuadorian-market-plants-using-a-screen-to-nature-participatory-approach-2376-0214-1000156.php?aid=68579>
- Greque de Morais, M., Da Silva, B., Greque de Morais, E., & Vieira, J. (2015). Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*, 1-16. Recuperado el 6 de octubre del 2016 de https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwid7L65h7rSAhVHxCYKHUyuAvQQFgg_MAQ&url=http%3A%2F%2Fwww.mdpi.com%2F2218-1989%2F3%2F4%2F1076%2Fpdf&usq=AFQjCNFJci7AhBBdEGtGn_g7NW5F8chBg&sig2=SMQ0LqTsERAYxjqNEYRe6Q
- Guamán, M., & González, N. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador*. Corporación para la Investigación Energética,

- Laboratorio de Biotecnología Energética, Quito, Ecuador. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <http://www.biotec.ec/>
- Guedes, C., Amaro, H., & Malcata, X. (2011). Microalgae As Sources of High Added Value Compounds A Brief Review of Recent Work. *Biotechnology Progress*, 597-613. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21452192>
- Harun, R., Singh, M., & Forde, G. D. (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1037-1047. Recuperado el 11 de septiembre de 2016 de http://justspirulina.org/wp-content/uploads/2014/07/Bioprocess_engineering_of_microalgae_to_produce_a_variety_of_consumer_products.pdf
- Hassan, M., Kubra, K., Hossain, M., Mustafa, G., Jainab, T., Karim, R., & Mehedy, E. (2015). Screening of Antibacterial and Antifungal Activity of Freshwater and Marine Algae as a Prominent Natural Antibiotic Available in Bangladesh. *International Journal of Pharmacology*, 828-833. Recuperado el 2 de agosto de 2016 de <http://scialert.net/fulltext/?doi=ijp.2015.828.833>
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 157-173. Recuperado el 2 de agosto de 2016 de <http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>
- Hurell, B., Schuster, S., Grun, E., Coutaz, M., Williams, A., & Held, W. (2015). Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. *Plos Pathogenic*. Recuperado el 5 de agosto de 2016 de <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004929>
- Ibañez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 703-709. Recuperado el 5 de agosto de 2016 de

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6023/abstract>

Kuskoski, M., Asuero, A., García, C., Troncoso, A., & Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de compuestos antociánicos. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 691-693. Recuperado el 8 de octubre del 2016 de http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612004000400036

Laboratorio de Biotecnología Energética. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://www.biotec.ec/>

Lara, R., Castro, T., Castro, J., & Castro, G. (2007). Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 29-36. Recuperado el 6 de agosto de 2016 de [19572007000100004](http://www.scielo.br/bmo/abstract/19572007000100004)

Laungsuwon, R., & Chulalaksananukul, W. (2013). Antioxidant and anticancer activities of freshwater green algae, *Cladophora glomerata* and *Microspora floccosa*, from Nan River in northern Thailand. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 181-188. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de www.mijst.mju.ac.th/vol7/181-188.pdf

Luna, J. (2009). Nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945): Una alternativa para la alimentación inicial de larvas de peces y crustáceos. *Investigación y Ciencia*, 1-7. Recuperado el 20 de septiembre de 2016 de <http://www.uaa.mx/investigacion/revista/archivo/revista45/Articulo%201.pdf>

Mahmoudvand, H., Shakibaie, M., Tvakoli, R., Jahanbakhsh, S., & Sharifi, I. (2014). In Vitro Study of Leishmanicidal Activity of Biogenic Selenium Nanoparticles against Iranian Isolate of Sensitive and Glucan time-Resistant *Leishmania tropica*. *Iranian Journal of Parasitology*, 452-460. Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de

www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4345083/

- Marín, E., Parra, C., Hernández, C., Hernáez, M., Nombela, C., Monteoliva, L., & Gil, C. (2015). *Candida albicans* Shaving to Profile Human Serum Proteins on Hyphal Surface. *Frontiers in Microbiology*, 1-16. Recuperado el 11 de agosto de 2016 de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26696967
- Marín, J., Torres, O., Santafé, G., & Robledo, M. (2015). Estudio fitoquímico y evaluación del Potencial Leishmanicida de la especie *Esenbeckia litoralis* (Rutacea). *Informacion tecnologica*. Recuperado el 10 de noviembre de 2016 de www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642016000100017
- Marín, M. (2011). Penicili na. *Toxicologia y Química Forense*, 1-5. Recuperado el 14 de octubre de 2016 de http://www.fetoc.es/asistencia/Toxicologia_clinica_libro.pdf
- Mikami, K., & Hosokawa, M. (2013). Biosynthetic Pathway and Health Benefits of Fucoxanthin, an Algae-Specific Xanthophyll in Brown Seaweeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 13763-13781. Recuperado el 8 de Agosto de 2016 de www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742216/
- Mimouni, V., Ulmann, L., Pasquet, V., & Laurent, M. (2015). The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2733-2750. Recuperado el 10 de agosto de 2016 de www.archives-ouvertes.fr/hal-01248050/document
- Ministerio de Salud Publica del Ecuador. (2015). Subsecretaria de Vigilancia de la Salud Pública Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. *Gaceta Epidemiológica Semanal* (10). Recuperado el 10 de agosto de 2016 de <http://www.salud.gob.ec/wp->

certainfresh water microalgae from Thamirabarani River, Tami Nadu, South India. *Asian Pacific Journal Tropical Biomed*, 1-7. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/45102/15/15_chapter%207.pdf

Pumarola, A. (2005). Escherichia. En A. Pumarola, A. Rodriguez, J. Garcia, & G. Angulo, *Microbiología y Parasitología Médica* (Segunda ed., págs. 435- 436). Salvat Editores S.A. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de <http://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>

Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N., Sridhar, S., & Rengasamy, R. (2008). A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, 77-88. Recuperado el 14 de agosto de 2016 de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18568862

Ribeiro, T., Chávez, M., Valadares, D., Franza, J., Lage, P., Duarte, M., . . . Castilho, R. (2014). Antileishmanial activity and citotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology*, 60-68. Recuperado el 11 de noviembre de 2016 de www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24846006

Richmond, A., & Hu, Q. (2013). Algae culturing. En A. Richmond, & Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (Segunda ed.). John Willey y Sons.

Rooney, B., Piening, T., Buscher, P., Roge, S., & Smales, C. (2015). Expression of Trypanosoma brucei gambiense Antigens in Leishmania tarento la. Potential for use in Rapid Serodiagnostic Tests. *Plos One Tropical Diseases*, 1-8. Recuperado el 11 de agosto de 2016 de www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/111/1/mic-1111.pdf?expires=1488484364&id=id&accname=guest&checksum=4244D8FEC87F93FE88C77CAF6E4A36B4

Salmani, H., Azarnezhad, A., Reza, M., & Hosseini, A. (2016). Pathotypic and

- Phylogenetic Study of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Uropathogenic *E. coli* Using Polymerase Chain Reaction. *Jundishapur Journal Microbiology*, 1-7. Recuperado el 14 de agosto de 2016 de www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4841981/
- Sanmukh, S., Bruno, B., Ramakrishan, U., Khairnar, K., Swaminathan, S., & Paunekar, W. (2014). Bioactive Compounds Derived from Microalgae Showing Antimicrobial Activities. *Aquaculture Research & Development*, 1-4. Recuperado el 15 de agosto de 2016 de www.omicsonline.org/open-access/bioactive-compounds-derived-from-microalgae-showing-antimicrobial-activities-2155-9546.1000224.pdf
- Santos, A., González, Y., & Martín, C. (2016). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. RAW 267 (ATTC TIB-71). Recuperado el 16 de agosto de 2016 de http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf
- Simoës, J., Bezerra, A., Moura, G., Araujo, H., Gut, I., Bayes, M., & Santos, M. (2016). The Fungus *Candida albicans* Tolerates Ambiguity at Multiple Codons. *Frontiers in Microbiology*, 1-11. Recuperado el 16 de agosto de 2016 de algae.ihb.ac.cn/english/algaeDetail.
- Skacelova, K., Bartak, M., Coufalik, P., Nyvtl, D., & Trnkova, K. (2013). Biodiversity of freshwater algae and cyanobacteria on deglaciated northern part of James Ross Island, Antarctica. A preliminary study. *CZECH POLAR REPORTS*, 93-106. Recuperado el 8 de agosto del 2016 de <http://www.sci.muni.cz/CPR/6cislo/Skacelova.pdf>
- Smith, G. (1950). *The Fresh-water Algae of the United States*. McGraw-Hill Book Company, Inc. NY.
- Sondi, I., & Salopek, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 177-182. Recuperado el 18 de Agosto de 2016 de pdfs.semanticscholar.org/44af/bb73424b4027e7153786847aa2300cf

1e ddc.pdf

- Valdéz, D., Larrondo, H., Herrera, M., Rivero, E., Zamora, R., & Araujo, L. (2008). Penicilinas. *Acta Médica*, 1-12.
- Volk, R., & Furbert, F. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*, 180-186.
- Yu, X., Chen, L., & Zhang, W. (2015). Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high value bioproducts. *Frontiers in Microbiology*, 1-10. Recuperado el 10 de octubre de 2016 de journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00056/full
- Zendejas, G., Ávalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomed*, 129-143. Recuperado el 26 de julio del 2016 de www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf

ANEXOS

ENSAYO LEISHMANICIDA

ANEXO 1. Tabla 1: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con el Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* frente a la actividad leishmanicida

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	77,45	66,67	73,68	72,60	5,47
2%EtOH	3,42	3,47	2,25	3,05	0,69
D1	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
D2	100,00	100,00	87,15	95,72	7,42
D3	65,45	44,44	49,44	53,11	10,98
D4	6,84	6,84	7,99	8,69	2,28
D5	18,80	15,97	17,98	17,58	1,46

Nota: NT no tratamiento; P antibiótico pentamidina; 2% EtOH etanol al 2%; D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5; SD desviación estándar; R1 repetición 1; R2 repetición 2; R3 repetición 3.

ANEXO 2. Tabla 2: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorella* frente a la actividad leishmanicida.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Penta	77,45	66,67	73,68	72,60	5,47
EtOH 2%	3,42	3,47	2,25	3,05	0,69
D1	100,0	100,0	100,0	95,27	8,19
D2	33,1	30,2	30,3	31,21	1,63
D3	20,7	27,8	25,8	24,78	3,64
D4	22,2	24,3	23,6	23,36	1,08
D5	18,6	24,3	21,3	21,40	2,88

ANEXO 3. Tabla 3: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorococcum* frente a la actividad leishmanicida.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	77,45	66,67	73,68	72,60	5,47
2%EtOH	3,42	3,47	2,25	3,05	0,69
D1	100,0	100,0	100,0	100,00	0,00
D2	44,4	43,8	36,8	41,70	4,22
D3	6,8	10,1	5,3	7,38	2,48
D4	20,3	15,3	18,0	17,85	2,52
D5	28,6	17,7	24,7	23,68	5,53

ANEXO 4. Tabla 4: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorococcus* frente a la actividad leishmanicida.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	83,08	83,64	87,72	72,60	5,47
2%EtOH	18,15	14,55	16,67	3,05	0,69
D1	100,0	100,0	100,0	100,00	0,00
D2	100,0	100,0	100,0	100,00	0,00
D3	19,1	22,5	21,1	20,87	1,71
D4	21,5	30,1	25,8	25,84	4,30
D5	22,5	22,4	19,1	21,32	1,92

ANEXO 5. Tabla 5: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Scenedesmus* frente a la actividad leishmanicida.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	83,08	83,64	87,72	72,60	5,47
EtOH 2%	18,15	14,55	16,67	3,05	0,69
D1	87,3	100,0	100,0	95,76	7,35
D2	15,5	25,3	21,3	20,70	4,91
D3	15,8	14,61	21,05	17,15	3,43
D4	12,3	19,76	15,73	15,92	3,74
D5	22,8	24,7	26,3	24,61	1,76

ANEXO 6. Tabla 6: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con la cepa *Synechococcus* frente a la actividad leishmanicida.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
P	83,08	83,64	87,72	72,60	5,47
2%EtOH	18,15	14,55	16,67	3,05	0,69
D1	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
D2	20,5	29,21	21,05	23,58	4,89
D3	26,27	23,60	26,32	25,39	1,56
D4	4,97	4,24	6,7	5,32	1,29
D5	21,9	20,98	21,35	21,42	0,48

Nota: NT no tratamiento; P antibiótico pentamidina; 2% EtOH etanol al 2%; D1 dilución 1; D2 dilución 2; D3 dilución 3; D4 dilución 4; D5 dilución 5; SD desviación estándar; R1 repetición 1; R2 repetición 2; R3 repetición 3.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

ANEXO 7. Tabla 7: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con el Consorcio *Chlorrella* y *Scenedesmus* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	44,05	37,72	39,89	40,55	3,22
2%EtOH	19,18	16,17	12,37	15,91	3,41
D1	69,91	72,64	66,85	69,80	2,90
D2	60,88	51,09	53,74	55,24	5,07
D3	31,74	24,74	29,73	28,73	3,60
D4	4	3,23	5,63	4,29	1,22
D5	19,14	21,58	20,12	20,28	1,23

ANEXO 8. Tabla 8: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorella* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	44,05	37,72	39,89	40,55	3,22
2%EtOH	19,18	16,17	12,37	15,91	3,41
D1	69,91	58,61	51,25	54,66	3,71
D2	25,92	14,27	21,42	20,53	5,88
D3	22,90	25,04	22,44	23,46	1,39
D4	24,46	23,95	22,92	23,78	0,78
D5	24,79	23,38	21,51	23,23	1,65

ANEXO 9. Tabla 9: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorococcum* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	24,99	23,87	19,35	22,74	2,99
2%EtOH	12,22	6,07	10,08	9,46	3,13
D1	100,00	100,00	100,00	100,00	0,00
D2	66,56	55,62	57,74	59,98	5,80
D3	32,02	27,14	23,11	27,42	4,46
D4	43,34	30,29	36,25	36,63	6,53
D5	22,57	23,03	22,05	22,55	0,49

ANEXO 10. Tabla 10: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Chlorococcus* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	41,83	24,99	23,87	19,35	24,43
2%EtOH	12,22	6,07	-24,45	-61,10	9,15
D1	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
D2	44,48	66,56	55,62	57,74	55,56
D3	32,02	27,14	23,11	13,85	27,42
D4	43,34	30,29	-3,15	-42,97	36,81
D5	22,57	23,03	-20,76	7,94	22,80

ANEXO 11. Tabla 11: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Scenedesmus* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	41,83	24,99	23,87	19,35	24,43
2%EtOH	12,22	6,07	-24,45	-61,10	9,15
D1	52,15	70,41	59,75	72,91	71,66
D2	41,65	25,87	-8,79	-33,10	33,76
D3	34,73	25,79	1,77	-12,83	30,26
D4	31,96	23,21	-0,51	-36,76	27,58
D5	25,86	42,05	3,15	18,02	21,94

ANEXO 12. Tabla 12: Resultados de las 3 repeticiones del ensayo con *Synechococcus* frente a la actividad citotóxica.

	R1	R2	R3	Promedio	SD
NT	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pd	41,83	24,99	23,87	19,35	24,43
2%EtOH	12,22	6,07	-24,45	-61,10	9,15
D1	49,49	51,09	21,77	37,88	50,29
D2	38,38	23,78	14,90	-7,23	31,08
D3	33,79	15,38	-0,33	-5,80	24,59
D4	26,78	22,20	-0,98	4,89	24,49
D5	22,79	12,67	13,09	15,07	12,88

ANEXO 13. MEDIO BG-11 (RippKa et al., 1979) (pH 8):

Medio utilizado para cianobacterias o para microalgas fijadoras de nitrógeno. En caso de que se trate de cultivar cianobacterias marinas, se utilizará agua de mar enriquecida con el medio o agua destilada con ClNa a 35UPS (3,5%).

Solución 1: 1L de solución		Solución 2: 1L de solución		Solución 3: 1L de solución		Solución 4: 1L de solución	
Reactivo	Cant (g)	Reactivo	Cant (g)	Reactivo	Cant (g)	Reactivo	Cant (g)
NaNO ₃	150	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	4	Ácido cítrico	0,6	H ₃ BO ₃	2,86
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7	EDTA	0,1	Citrato de sodio	0,6	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81
CaCl ₂ ·2H ₂ O	3,6	Na ₂ CO ₃	2			ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22
						NaMoO ₄ ·5H ₂ O	0,39
						CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,8
						Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,05
						FeCl ₃	0,22

ANEXO 14. Bold Basal Medium (Bold 1949, Bischoff and Bold 1963)

Component	Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
<i>Macronutrients</i>			
NaNO ₃	25.00	10 mL	2.94×10^{-3}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.50	10 mL	1.70×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	10 mL	3.04×10^{-4}
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	4.31×10^{-4}
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	1.29×10^{-3}
NaCl	2.50	10 mL	4.28×10^{-4}
<i>Alkaline EDTA Solution</i>		1 mL	
EDTA	50.00		1.71×10^{-4}
KOH	31.00		5.53×10^{-4}
<i>Acidified Iron Solution</i>		1 mL	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98		1.79×10^{-5}
H ₂ SO ₄		1 mL	
<i>Boron Solution</i>		1 mL	
H ₃ BO ₃	11.42		1.85×10^{-4}
<i>Trace Metals Solution</i>		1 mL	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82		3.07×10^{-5}
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44		7.28×10^{-6}
MoO ₃	0.71		4.93×10^{-6}
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57		6.29×10^{-6}
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49		1.68×10^{-6}

ANEXO 15. Medio de cultivo de avena para *Panagrellus redivivus* modificado de Lara, R., Castr, T., Castro, J y Castro, G. (2007):

- Se esteriliza en el microondas por 5 minutos los seis recipientes de las siguientes medidas: 15x15cm y 5 cm de altura.

- Estos recipientes se colocaron 200g de hojuelas de avena y 300mL de agua purificada.
- Se mezclaron los ingredientes y a los recipientes se les añade 200 mL de agua purificada para que los medios queden hidratados.
- La siembra del *P. redivivus* se hizo añadiendo 5 g de este organismo, en cada recipiente y mezclándolos para que queden distribuidos.
- Cubrir con la tapa o una malla al cultivo.
- Este cultivo se mantuvo, durante nueve semanas, a temperatura ambiente (19-22°C), con un pH de 2,6-3,2.
- Diariamente se revisó el cultivo, reponiendo solamente con agua purificada.

ANEXO 16. Procedimiento para la preparación del La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) modificado de Laboratorio de Genómica Viral y Humana. (2008):

- Se prepara 100 mL de Ácido Clorhídrico 1M (1M HCl) añadiendo 8.62 mL de HCl concentrado a 91 mL de dH₂O, anticipadamente fueron colocados en un vaso precipitado de 250 mL. Mezclar en una plancha agitadora magnética durante 5 minutos.
- Aforar a 100 mL con dH₂O.
- Preparar 100 mL de Hidróxido de Sodio 10M (10M NaOH) añadiendo 40 g de NaOH a 40 mL de dH₂O anticipadamente siendo colocados en un vaso precipitado de 250 mL.
- Mezclar hasta que el NaOH se haya disuelto por completo.
- Aforar a 100 mL con dH₂O.
- Añadir un 80% del volumen de dH₂O requerido y mezclar encima del agitador magnético hasta diluir las sales que se encuentran.
- Ajustar el pH a 7.4 con 1M HCl o 10M NaOH

- Filtrar la solución a través de los discos de 0.45 μm para que se elimine las partículas suspendidas.
- Esterilizar en la autoclave.
- Se distribuye las alícuotas de 50 mL en tubos cónicos esterilizados.
- Almacenar a temperatura de 4-8 °C.

ANEXO 17. Protocolo MTT

- Elija un recipiente apropiado resistente a los disolventes y trabaje en una campana ventilada.
- Preparar 40% (vol / vol) de dimetilformamida (DMF) en ácido acético glacial al 2% (vol / vol).
- Añadir 16% (p / v) de dodecilsulfato sódico (SDS) y disolver.
- Ajustar a pH = 4,7
- Almacenar a temperatura ambiente para evitar la precipitación de SDS. Si se forma un precipitado, se calienta a 37 ° C y se mezcla para solubilizar SDS.
- *MTT Protocolo de Ensayo*
- Preparar las células y los compuestos de ensayo en placas de 96 pocillos que contienen un volumen final de 100 μl / pocillo.
- Incubar durante el período de exposición deseado.
- Añadir 10 μl de solución MTT por pocillo.
- Incubar de 2 horas a 37 ° C.
- Añadir 100 μl de solución de solubilización a cada pocillo para disolver los cristales de formazano.
- Mezclar para asegurar la solubilización completa.
- Registre la absorbancia a 570 nm.

ANEXO 18. Cultivo de Leishmania mexicana modificado de Hernández, I., Martinetti, J., Escobar, P. (2014).

- Se prepara el medio de Schneider (cultivo de células de insectos) Drosophila Gibco medium, complementado con suero bovino fetal.
- Se prepara el medio TC 199 (cultivo de células de mamíferos), suplementado con 20% de suero bovino fetal (Sterile System Hy-CloneUSA) inactivado, por 30 minutos, a 56°C.
- Se prepara el medio agar sangre Difco (DAB), preparado como recomendado por Walton et al y 15% de sangre desfibri nada de conejo. La fase líquida constituida por suero fisiológico, 0,85%.
- Se utiliza frascos plásticos de 25 ml conteniendo, cada uno de ellos 5 ml del medio líquido.
- La muestra de Leishmania mexicana se toma a una concentración de 1×10^6 promastigotes por ml, en un volumen de 100 ml del medio.
- Se inocula de manera aséptica y dejando por 72 horas.
- El recuento del número aproximado de promastigotes por ml fue hecho en experimentos por triplicado, con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases.
- La observación del crecimiento en los frascos de cultivo fue por medio de un microscopio estereoscopio invertido Zeiss-Jena.
- Se criopreserva los “stocks” con nombre, fecha y número de frasco, para siguientes experimentaciones.

ANEXO 19 ÍNDICE DE ABREVIATURAS

LB: Medio Luria Bertani

BB: Bold Basal Medium

BG-11: Medium for Blue Green

Algae YM: Yeast Mold Medium

MTT: 2H-tetrazolio, 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil bromuro

ABTS: Ácido 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)

PBS: Solución Buffer fosfato salina

DMSO: Dimetik sulfóxido

RAW 264.7: Cell Line

murine

IC50: Concentración Inhibitoria media

CIE: Corporación para la Investigación Energética

BIOTEC: Laboratorio de Biotecnología Energética

CMIE: Colección de microalgas para Investigación del

Ecuador INSPI: Instituto Nacional de Investigación en Salud

Pública

