

# Determinación de los parámetros de citotoxicidad y capacidad antioxidante de biomasa purificada de la microalga *Porphyridium cruentum*

**Laura E. Romero Robles**

ITESM, Monterrey, Nuevo León, México, romero@itesm.mx

**Carlos Granados Contreras**

ITESM, Monterrey, Nuevo León, México, A01133766@itesm.mx

## ABSTRACT

Algae and natural extracts have become of especial interest to the cosmetic industry due to their high antioxidant content and low toxicity. The red microalga *Porphyridium cruentum* has shown superior properties compared to the traditional compounds known as antioxidants. In order to evaluate the possible addition of the alga extract into dermocosmetic formulations cytotoxicity parameters such as IC50 and LD50 were determined using mesenchymal stem cells. A *Porphyridium cruentum* culture was purified, lyophilized and characterized using UV-Vis spectrometry and fluorescence microscopy. It was possible to account that the lyophilized extract has an antioxidant capacity equivalent to 0.6674g of ascorbic acid; this value is particularly high since it is being compared to a pure antioxidant whereas the lyophilized extract only contains 0,1% w/w of carotenoids and 2% w/w of b-phycoerythrin. Through cell viability assays it was proven such extract has no cytotoxic effect in a given sample of human mesenchymal stem cells during a 48h study. A cytotoxic effect was observed using concentrations much higher than those intended for cosmetic use, which leads us to confirm their harmlessness for dermocosmetic use.

**Keywords:** Microalgae; antioxidant capacity; *Porphyridium cruentum*; stem cells; cytotoxicity

## RESUMEN

En el afán de crear productos alternos, las algas y extractos naturales han sido de especial interés para la industria cosmética debido a su alto contenido de antioxidantes y su baja toxicidad. La microalga roja *Porphyridium cruentum* ha demostrado propiedades superiores contra los radicales libres, en comparación con los compuestos tradicionales conocidos como antioxidantes. Con el fin de evaluar la posible incorporación del extracto de alga en formulaciones dermocosméticas, parámetros de citotoxicidad como CI50 y DL50 se determinaron utilizando células madre mesenquimales. Un cultivo de *Porphyridium cruentum* se purificó, se liofilizó y se caracterizó utilizando espectrometría de UV-Vis y microscopía de fluorescencia. La presente investigación, permite demostrar que el extracto liofilizado tiene una capacidad antioxidante equivalente a 0.6674 g de ácido ascórbico; Este valor es particularmente alto, ya que está siendo comparado con un antioxidante de alta pureza mientras que el extracto liofilizado sólo contiene 0,1% p / p de carotenoides y 2% p / p de β-ficoeritrina. A través de ensayos de viabilidad celular fue evaluado el extracto demostrando que no tiene ningún efecto citotóxico en una muestra dada de células madre mesenquimales humanas durante un estudio de 48 h. Se observó un efecto citotóxico utilizando concentraciones muy superiores a los destinados para uso, que nos lleva a confirmar que la inocuidad para uso dermocosmético.

**Palabras claves:** Microalga; capacidad antioxidante; *Porphyridium cruentum*; células madre; citotoxicidad.

## 1. INTRODUCCION

A pesar de las presiones económicas que sufre el mundo y el sector industrial, como el colapso de la economía estadounidense en 2008 y la crisis de la eurozona desde 2009 [1, 2], la industria dermocosmética se ha mantenido en constante crecimiento. En el afán de crear nuevos productos, las algas y los extractos de éstas y otros productos naturales han despertado particular interés de los investigadores por su alto contenido en antioxidantes y su baja toxicidad [3-6].

En general, los antioxidantes son moléculas que protegen al cuerpo evitando que los radicales libres oxiden a los tejidos del cuerpo [10]. El *Porphyridium cruentum*, es una micro alga roja rica en astaxantina,  $\beta$ -ficoeritrina y carragenanos. La astaxantina pertenece a la familia de los carotenoides, los cuales son pigmentos orgánicos que participan en los procesos de transferencia de energía y protegen a los organismos de la oxidación, la astaxantina tiene hasta 10 veces más potencial antioxidante que otros carotenoides como el  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y el licopeno [7]. Por otra parte, la  $\beta$ -ficoeritrina es una proteína coloreada encontrada en la naturaleza y forma parte del grupo de las ficobiliproteínas. Los carragenanos, por otra parte, son polisacáridos con propiedades humectantes y reológicas particulares de las algas rojas [8]. A dichos polisacáridos son a los que se les atribuye la función antioxidante e inmunomoduladora de la microalga *Porphyridium cruentum* [9-11].

Diversos grupos de investigación han comprobado la superioridad de las algas como antioxidantes naturales en comparación con antioxidantes tradicionales como la vitamina E, la vitamina C y los carotenos [7]. No obstante los ensayos realizados han sido in-vitro y no se puede asegurar que la capacidad antioxidante se conserve en un modelo celular o que no resulte citotóxica. En este estudio se determinarán los parámetros de toxicidad y la capacidad antioxidante total del alga *Porphyridium cruentum* utilizando como modelo células madre mesenquimales humanas para evaluar la posibilidad de incorporar dicho extracto en formulaciones dermocosméticas avanzadas.

Las células madre mesenquimales son obtenidas de tejido adiposo, derivado del mesoderma, por medio de un proceso quirúrgico de liposucción. Éstas son ampliamente estudiadas por el potencial terapéutico que poseen debido a sus habilidades de diferenciación en otros tipos de tejidos. La gran ventaja de utilizar células madre adultas es su facilidad de obtención y el hecho de que su uso no implica problemas éticos o legales como en el uso de células madre embrionarias [12-18].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Reactivos

Acetato de sodio (ACS 99% Sigma Aldrich), ácido Lascórbico (Reactivo CTR), agua bidestilada desionizada, CellTiter 96® AQueous (Promega), dimetilsulfóxido (DMSO) (Biología molecular 99.9% Sigma Aldrich),  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (ACS 97% Sigma Aldrich), HCl (ACS 37% CTR), medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM/F-12) Gibco®, Pen-Strep Gibco®, solución amortiguadora de fosfato (PBS) Gibco®, suero bovino fetal descomplementado (SBF) Gibco®.

### 2.2. Instrumentación

Campana de seguridad biológica clase II Labconco® Delta, centrífuga Beckman® GS-15R, espectrofotómetro de UVVis Thermo Biomate5®, incubadora Percival Scientific CU22L®, lector de microplacas Biotek Synergy H4®, liofilizadora Labconco FreeZone 2.5®, microscopio de Zeiss Apotome Axio Imager Z1®.

### 2.3. Metodología para la purificación de biomasa de *Porphyridium cruentum*

La metodología que se sigue para la purificación de la biomasa de *Porphyridium cruentum* es la descrita por Richmond y Benavides [19, 20]. Se toma 1 mg aproximadamente de biomasa del alga y se colocan en cajas de Petri con diferentes medios de cultivo estériles –AMA, AMA enriquecido con levadura y peptona, F/2, MB3N y BG11 preparados según el protocolo de la UTEX [21]. Una vez establecido el medio de cultivo óptimo para el alga se toman 0.1 g de biomasa del alga y se inoculan en 250 mL de medio de cultivo estéril en matraces Erlenmeyer de 1 L. Los matraces son cubiertos con papel aluminio y colocados en una incubadora Percival

Scientific CU22L® bajo luz blanca cálida de 17 Watts con una incidencia de 4  $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2} \text{mA}^{-1}$ , simulando condiciones de aguas marinas profundas, a 25°C y 5% de CO por un lapso de 2 semanas.

#### **2.4. Metodología para la liofilización del cultivo de *Porphyridium cruentum***

En un tubo de centrifuga de 50mL BD Falcon® se colocan 30mL de la suspensión de alga y se centrifuga a 1500 rpm por un lapso de 3 min. El precipitado se transfiere en un tubo de centrifuga nuevo. El proceso se repite hasta terminar con toda la suspensión de alga contenida del matraz; los precipitados se concentran en un solo tubo y se centrifugan nuevamente a 1500 rpm por 3 min. El sobrenadante se retira por completo, el tubo se recubre con papel aluminio para protegerlo de la luz y

se congela a -80°C por 24 h. Una vez congelado el tubo se coloca en una liofilizadora Labconco FreeZone 2.5®, se hace vacío hasta lograr una presión de  $4.34 \times 10^{-5}$  atm y una temperatura de -50°C y se deja liofilizar por 72 h. El tubo se retira del aparato y se almacena a -80°C para futuro uso. 2.5. Metodología para el lisado del liofilizado de *Porphyridium cruentum*. Se colocan 4 mg de liofilizado de *Porphyridium cruentum* en un tubo de centrifuga de 15 mL BD Falcon®; el lisado se realiza mecánicamente presionando el alga sobre las paredes del tubo y se somete a estrés osmótico agregando 1 mL de agua bidestilada desionizada, como se describe en la metodología de Ramos [22]. Se centrifuga a 1000g por 20 min y el sobrenadante se filtra a través de una membrana de polietersulfona con un diámetro de poro de 0.20 mm para obtener un extracto estéril. Para preparar extracto apto para el uso en cultivos celulares el agua bidestilada desionizada debe sustituirse por PBS.

#### **2.6. Metodología para la caracterización del liofilizado de *Porphyridium cruentum***

La caracterización del liofilizado se hizo por medio de espectroscopía UV-Vis y por microscopía de fluorescencia para verificar la presencia de b-ficoeritrina y otros antioxidantes.

##### **2.6.1. Espectrofotometría UV-Vis**

En un tubo de centrifuga de 15 mL BD Falcon® se coloca 1 mL de solvente – agua bidestilada desionizada, solución amortiguadora de fosfato (PBS), agua bidestilada desionizada 2 C. Granados et al. / J. Am. Chem. Soc. 2012, con 0.1% de DMSO, PBS con 0.1% de DMSO o hexano junto con 1 mg de liofilizado de *Porphyridium cruentum* y se sigue el procedimiento de lisado descrito anteriormente. Se colocan 0.5 mL del extracto en una celda de plástico y se leen en un espectrofotómetro de UV-Vis Thermo Biomate5® desde una longitud de onda de 490 hasta 600 nm.

##### **2.6.2. Microscopía de fluorescencia**

En un portaobjetos se colocan 1 mg de liofilizado de alga y 1 gota de una solución al 10% de glicerol en PBS, la muestra es cubierta con un cubreobjetos y se coloca en un Microscopio de Zeiss Apotome Axio Imager Z1®. Se adquieren imágenes con un objetivo de 100x utilizando el conjunto de filtros 00-PI específicos para la b-ficoeritrina.

#### **2.7. Metodología para la determinación de la citotoxicidad**

del extracto de *Porphyridium cruentum* mediante el método de viabilidad celular CellTiter®. La determinación de la viabilidad celular se basa en el protocolo de CellTiter®; el cual es un método colorimétrico basado en la formación de un compuesto de formazán producto de la reducción de un compuesto de tetrazolio.

La cantidad de formazán medida a una longitud de onda de 490 nm es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo [23, 24]. En una placa de cultivo de 96 pozos Corning Costar® se colocan 4,000 células madre mesenquimales humanas, se añade extracto de *Porphyridium cruentum* en concentraciones de 0, 10, 50, 100, 200, 400 y 600 mg/mL. Se añade suficiente medio de cultivo DMEM/F-12 con 10% de SBF para completar un volumen total de 100 mL por pozo. La placa se incuba por 48 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 2 las 48 h se agrega en cada pozo 20 mL de CellTiter® y se vuelve a incubar en las mismas condiciones por 3 h. Se retira la placa de la incubadora y se lee en un lector de microplacas Biotek Synergy H4® a una longitud de onda de 490 nm. Ésta prueba se realiza por cuadruplicado.

#### **2.8. Metodología para la medición de la capacidad antioxidante por el método FRAP**

La solución FRAP es preparada mezclando: 25 mL de solución amortiguadora de acetato 300 mM pH 3.6, 2.5 mL de una solución de FeCl<sub>3</sub> \*6H<sub>2</sub>O 20 mM y 2.5 mL de una solución 10 mM de 2,4,5-tripiridil-s-triazina disuelto en HCl 40 mM. En una placa de 48 pozos Corning Costar® se colocan 100 mL de extracto de liofilizado de *Porphyridium cruentum* para ensayar por triplicado. Por medio de una micropipeta Multipette® se colocan rápidamente en cada pozo con muestra 300 mL de solución FRAP. La placa se lee en un lector de microplacas

Biotek Synergy H4® a una longitud de onda de 593 nm inmediatamente después de colocar la solución FRAP y a los 4 min de la adición [25]. Los resultados se comparan con la absorbancia dada por soluciones de concentración conocida de ácido ascórbico.

### 3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

#### 3.1. Resultados de la purificación de biomasa de *Porphyridium cruentum*

El medio AMA enriquecido con levadura y peptona resultó ser muy nutritivo y favoreció la proliferación bacteriana. Los medios MB3N y BG11 de agua de mar dulce favorecieron el crecimiento de alga verde, de acuerdo a la literatura [21]. De los medios de agua de mar salada AMA y F/2 resultó ser mejor el AMA; ya que favorecía principalmente el crecimiento del alga roja. Once matraces fueron obtenidos del cultivo en masa de *Porphyridium cruentum* con un volumen efectivo de 250 mL cada uno, lográndose un volumen total de 2.75 L de cultivo confluyente en un lapso de dos semanas. Un total de 35 g de masa húmeda de *Porphyridium cruentum* purificado fueron recolectados.

#### 3.2. Resultados de la liofilización del cultivo de *Porphyridium cruentum*

De los 35 g de masa húmeda de *Porphyridium cruentum* purificado se obtuvieron en total 1.285 g de liofilizado de alga. Esto representa el 3.67% de la masa húmeda; es decir, por cada gramo de alga húmeda se obtuvieron 36.7 mg de alga liofilizada.

#### 3.3. Resultados de la caracterización del liofilizado de *Porphyridium cruentum*

En la Fig.1 se muestran los espectros de UV-Vis de extractos de liofilizado de *Porphyridium cruentum* en diferentes solventes. Una mayor absorbancia implica un mayor poder de extracción de los compuestos presentes en el liofilizado. Se determinó que el agua bidestilada desionizada y el PBS fueron el mejor y el segundo mejor solvente respectivamente debido a que presentaron los valores más altos de absorbancia. La longitud de onda en la que la el extracto de *Porphyridium cruentum*.

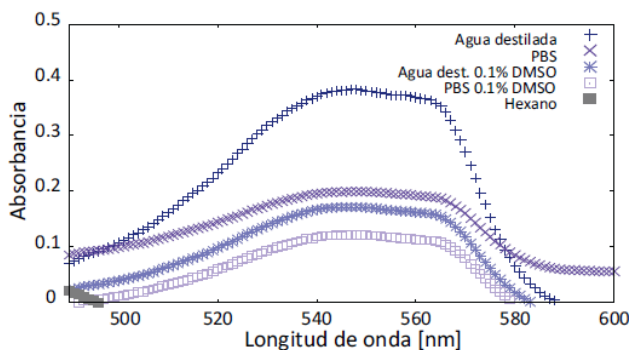
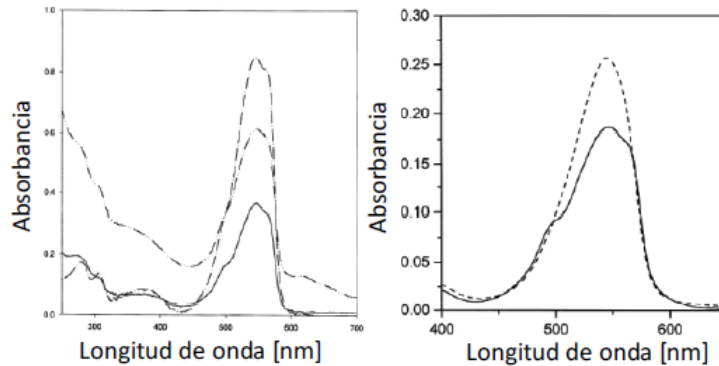


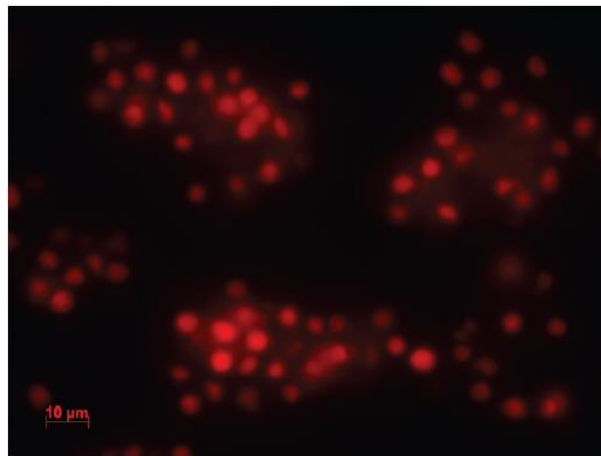
Fig. 1 Espectros de UV-Vis de extractos de liofilizado de *Porphyridium cruentum*

Los resultados concuerdan con el reportado en la literatura para la b-ficoeritrina [19, 22, 26-29] mostrado en la Fig.2, por lo cual se asume que en el proceso de liofilizado y extracción no se perdió el pigmento. Por otra parte se comprobó la presencia de b-ficoeritrina por medio de imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia Zeiss Apotome Axio Imager Z1®.



**Fig.2** Espectro de absorción de extractos de liofilizado de *Porphyridium cruentum* en agua destilada. Editado de referencia [27]

Los puntos en color rojo de la Fig.3 corresponden a la emisión de fluorescencia de la  $\beta$ -ficoeritrina a una longitud de onda de 576 nm.



**Fig.3** Microscopía de fluorescencia de liofilizado de *Porphyridium cruentum*, 100 X

### 3.4 Resultados de la determinación de la citotoxicidad del extracto de *Porphyridium cruentum* mediante el método de viabilidad celular CellTiter®

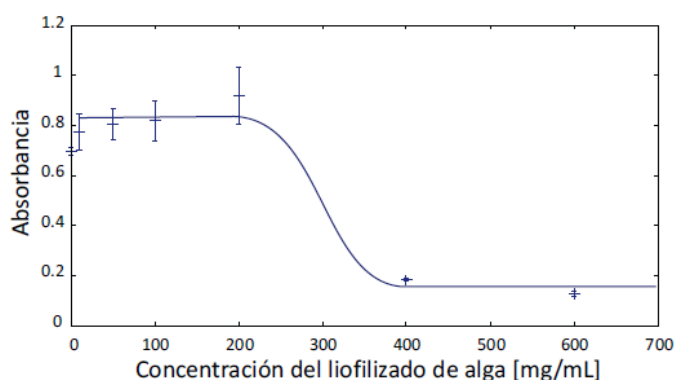
Un estudio de la linealidad de la respuesta obtenida mediante el protocolo de viabilidad celular CellTiter® fue realizado, con el cual se determinó el rango de trabajo en base a la porción de la curva que presenta mayor linealidad; que comprende de 2,000-6,000 células. La desviación estándar relativa calculada es menor al 10% para cualquiera de los puntos, lo cual está dentro del criterio de aceptación de la Eurachem [30]. Se determinó el límite de detección del método (LDM) en 436 células y el límite de cuantificación del método (LCM) en 960 células; lo cual es similar al valor de 800 células reportado por el fabricante respecto a éste método. Los resultados del ensayo para determinar la citotoxicidad del extracto del liofilizado de *Porphyridium cruentum* se muestran en la Tabla.1.

La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 490 nm y le fue restada la absorbancia del extracto de *Porphyridium cruentum* y del medio de cultivo DMEM/F-12 con 10% de SBF para obtener los valores de absorbancia sustraída usados en los cálculos.

**Tabla 1.** Resultados del ensayo para determinar la citotoxicidad del extracto del liofilizado de *Porphyridium cruentum*

Concentración de liofilizado [mg/mL]	Absorbancia promedio	Absorbancia del alga	Absorbancia del medio	Absorbancia sustraída	Desviación Estándar	% Desviación Estándar Relativa
0	0.8320	0.0450	0.0910	0.6960	0.0146	1.7593
10	0.9210	0.0620	0.0850	0.7740	0.0723	7.8549
50	0.9340	0.0450	0.0840	0.8050	0.0615	6.5890
100	0.9480	0.0530	0.0740	0.8210	0.0807	8.5116
200	1.0865	0.1040	0.0620	0.9205	0.0232	2.1381
400	0.4380	0.2110	0.0440	0.1830	0.0057	1.3099
600	0.6732	0.4990	0.0450	0.1292	0.0085	1.2684

En la Fig.4 se puede observar cómo la cantidad de células viables se mantiene relativamente constante en el rango de 0-200 mg/mL y cae súbitamente en el siguiente punto —400 mg/mL— para mantenerse constante de nuevo.



**Fig. 4** Resultados del ensayo para determinar la citotoxicidad del extracto del liofilizado de *Porphyridium cruentum*.

Las absorbancias de las concentraciones de 0, 10, 50, 100 y 200 mg/mL de extracto de *Porphyridium cruentum* corresponden a 3601, 4364, 4667, 4823 y 5797 células viables respectivamente después de haber estado en contacto 48 h con el alga; el incremento en la cantidad de células medidas respecto a las originalmente sembradas se ve explicada tanto por el hecho de que las células se encuentran en un medio nutritivo y proliferan como por la variación de la respuesta de la curva, la cual es de 437 células. La desviación estándar calculada para todos los puntos es menor al 10%, lo cual está dentro del criterio de aceptación de la Eurachem [30]. Las absorbancias de las concentraciones de 400 y 600 mg/mL de extracto de *Porphyridium cruentum* se encuentran muy por debajo del límite de detección, por lo que se concluye que a esas concentraciones la viabilidad es nula; es decir, a partir de una concentración de 400 mg/mL se observa un efecto citotóxico que “mata” a toda la muestra de células, o cuando menos, quedan viables tan pocas que caen debajo del límite de detección del método.

Por otro lado, se obtuvo el cálculo de viabilidad del 50%, conocido como valor LD50. El valor interpolado en el modelo corresponde a una concentración de 270.69 mg/mL de extracto de liofilizado de *Porphyridium cruentum*. El valor necesario para considerar a un compuesto inofensivo en aplicaciones dérmicas según el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, por sus siglas en inglés) es de 22,600 mg/kg [31]; el

valor de LD50 estimado para el extracto de liofilizado de *Porphyridium cruentum* es más de 10 veces mayor al valor necesario para considerarlo inofensivo para la salud.

### 3.5 Resultados de la medición de la capacidad antioxidante por el método FRAP

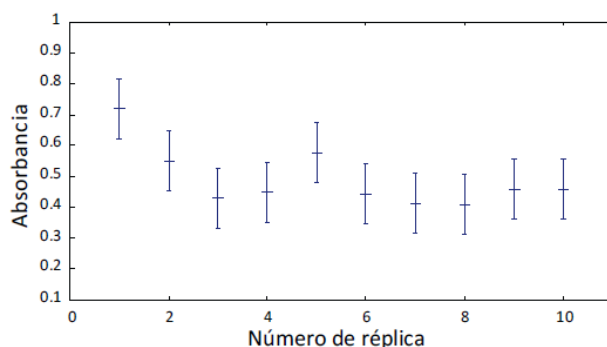
Se realizó un estudio de la linealidad de la respuesta obtenida mediante el protocolo de FRAP con el cual se determinó el rango de trabajo en base a la porción de la curva que presenta mayor linealidad; el cual va de una concentración de 60 a 120 mM de ácido ascórbico. La desviación estándar relativa calculada para los puntos dentro de la curva es menor al 10%, lo cual está dentro del criterio de aceptación de la Eurachem [30]. Se determinó el límite de detección del método (LDM) en 1.5466 M y el límite de cuantificación del método (LCM) en 3.4059 M para las concentraciones de ácido ascórbico.

**Tabla 2.** Resultados de las mediciones de absorbancia del extracto de *Porphyridium Cruentum* por el método FRAP

Réplica	Absorbancia	Absorbancia Blanco	Absorbancia sustraída	Desviación estándar
1	0.718	0.136	0.582	0.0973
2	0.549	0.136	0.413	0.0973
3	0.43	0.136	0.294	0.0973
4	0.448	0.136	0.312	0.0973
5	0.576	0.136	0.44	0.0973
6	0.443	0.136	0.307	0.0973
7	0.411	0.136	0.275	0.0973
8	0.409	0.136	0.273	0.0973
9	0.457	0.136	0.321	0.0973
10	0.458	0.136	0.322	0.0973

Los resultados de las mediciones de la absorbancia de la mezcla de extracto de *Porphyridium Cruentum* y solución FRAP se muestran en la Tabla 2. Los resultados de absorbancia sustraída se obtuvieron restándole a la respuesta la absorbancia de un blanco conteniendo solamente extracto de *Porphyridium Cruentum*. Como se puede observar en la Fig. 5, no existe dispersión significativa en los datos de las 10 mediciones independientes que se realizaron.

El valor promedio de la absorbancia del extracto de *Porphyridium Cruentum* equivale a la capacidad antioxidante de una solución de ácido ascórbico 79.77 M. Debido a que había 0.1 mL tanto del estándar de ácido ascórbico en la curva de calibración como del extracto de *Porphyridium cruentum* ensayado, se puede calcular que 1 g de liofilizado de alga tiene una capacidad antioxidante equivalente a 0.6674 g de ácido ascórbico. Este valor es particularmente alto considerando que se está comparando con un antioxidante puro, cuando sólo un 0.1% del peso en seco del liofilizado de *Porphyridium cruentum* corresponde a los carotenoides y alrededor del 2% a la  $\beta$ -ficoeritrina [8, 32].



**Fig. 5.** Gráfico de dispersión de las mediciones de absorbancia del extracto de *Porphyridium Cruentum* por el método FRAP

## 4. CONCLUSIONES

### 4.1. Conclusiones de la purificación de biomasa de *Porphyridium cruentum*

La proliferación bacteriana y de otras especies de algas se explica debido a que la biomasa utilizada se encontraba contaminada con alga verde, café, hongo y bacterias; no obstante, en menos de un mes, después de la purificación y con el medio AMA enriquecido con levadura y peptona se lograron tener 2.75 L de un cultivo purificado de *Porphyridium cruentum*, el cual fue suficiente para los fines requeridos.

### 4.2. Conclusiones de la liofilización del cultivo de *Porphyridium cruentum*

Se logró llevar a cabo la liofilización del cultivo de *Porphyridium cruentum* y se obtuvieron un total de 1.285 g de alga liofilizada; ésta cantidad fue más del doble de lo necesario para conducir los experimentos aquí descritos. La liofilización de esta microalga no supone ninguna consideración especial fuera de las contempladas en la metodología reportada en la literatura.

### 4.3. Conclusiones de la caracterización del liofilizado de *Porphyridium cruentum*

Por medio de técnicas espectrofotométricas y de fluorescencia se pudo comprobar que el proceso descrito en las metodologías no supone pérdidas significativas en la cantidad de antioxidantes que contribuyen a dar los valores de absorbancia característicos de esta alga.

### 4.4 Conclusiones de la determinación de la citotoxicidad del extracto de *Porphyridium cruentum* mediante el método de viabilidad celular CellTiter®

A través de ensayos de viabilidad celular se pudo comprobar que los extractos acuosos de *Porphyridium cruentum* no poseen efecto citotóxico en una población de células madre mesenquimales humanas durante un periodo de 48 h. El valor necesario para considerar a un compuesto inofensivo en aplicaciones dérmicas según el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH, por sus siglas en inglés) es de 22,600 mg/kg [31]; el valor de LD50 estimado para el extracto de liofilizado de *Porphyridium cruentum* es más de 10 veces mayor al valor necesario para considerarlo inofensivo para la salud. Esto es de particular importancia ya que se demuestra que el *Porphyridium cruentum* puede ser usado en aplicaciones dermocosméticas sin presentar efectos citotóxicos.

### 4.5 Conclusiones de la medición de la capacidad antioxidante por el método FRAP

Se logró comprobar la elevada capacidad antioxidante que poseen los compuestos del alga *Porphyridium cruentum*. Cada 1 g de liofilizado de alga se calculó que tiene una capacidad antioxidante equivalente a 0.6674 g de ácido ascórbico. Este valor es particularmente alto considerando que se está comparando con un antioxidante puro, cuando sólo un 0.1% del peso en seco del liofilizado de *Porphyridium cruentum* corresponde a los carotenoides y alrededor del 2% a la  $\beta$ -ficoeritrina.

### 4.6 Conclusiones generales y recomendaciones a trabajos futuros



Basándose en la información obtenida en este estudio, se puede afirmar que los extractos de liofilizado de cultivo purificado de *Porphyridium cruentum* tienen una alta capacidad antioxidante debido a la diversidad de compuestos fenólicos, carotenos y pigmentos que posee. El efecto citotóxico observado de los extractos de liofilizados de *Porphyridium cruentum* ocurrió en concentraciones mucho más elevadas que aquellas en las que serían usados en las formulaciones. Se sugiere explorar el rango de concentraciones entre 200 y 300 mg/mL de liofilizado de alga para encontrar una concentración más cercana al valor real de LD50. Otros métodos como el ORAC y el TEAC para medir capacidad antioxidante pueden ser probados para determinar su eficacia contra otros radicales libres.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Journal, T.W.S., *Quarterly Financials for General Motors Co.*, 2008.
- (2) Commission, E., *Economic Crisis in Europe: Causes, Consequences and Responses*, in *European Economy*, E.a.F.A.o.t.E. Commission, Editor 2009: Luxembourg.
- (3) Baccou, J.-C., J. Point, and B. Baroux, *A heat-stable extract with antioxidant and wound healing activities from microalgal culture broth*, 2000, Aquamer Saem, Fr. . p. 10 pp.
- (4) Niwano, Y., et al., *Red tide plankton antioxidant extractions as hydroxyl radical scavengers, health foods, and cosmetics*, 2008, Sunny Health Co., Ltd., Japan; National Research Institute of Fisheries Science; Nagasaki University .p. 12pp.
- (5) Bar Ilan “*Antioxidants isolated from plant extracts for pharmaceutical and cosmetic use*, 1990, University, Israel . p. 43 pp.
- (6) Rodriguez-Garcia, I. and J.L. Guil-Guerrero, *Evaluation of the antioxidant activity of three microalgalspecies for use as dietary supplements and in the preservation of foods*. Food Chemistry, 2008. 108(Copyright (C) 2011.American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p.1023-1026.
- (7) Naguib, Y.M.A., *Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids*. Journal of Agriculturaland Food Chemistry, 2000. 48(4): p. 1150-1154.
- (8) F.G. Ación Fernández, J.A.S.P., José Luis Guil Guerrero, M.D. Gil García, María del Mar Reboloso Fuentes, *Nutrient composition of the biomass of the microalga Porphyridium cruentum*. Food science and technology international 2000. 6(2): p. 129-135.
- (9) Sokolova, E.V., et al., *In Vitro and Ex Vivo Studies of Antioxidant Activity of Carrageenans, Sulfated Polysaccharides from Red Algae*. Bull. Exp. Biol. Med., 2011. 150(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 426-428.
- (10) Sun, L.-q., et al., *Degradation of polysaccharide from Porphyridium cruentum and its antioxidant activities in vitro*. Huadong Ligong Daxue Xuebao, Ziran Kexueban, 2010. 36(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 211-215.
- (11) Tannin-Spitz, T., et al., *Antioxidant activity of the polysaccharide of the red microalga Porphyridium sp.* J.Appl. Phycol., 2005. 17(Copyright (C) 2011 American Chemical Society (ACS). All Rights Reserved.): p. 215-222.
- (12) Zhu, Y., et al., *Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC*. Cell Biochemistry and Function, 2008. 26(6): p. 664-75.
- (13) Bunnell, B.A., et al., *Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation*. Methods, 2008. 45(2): p. 115-20.
- (14) Bosio, A., U. Bissels, and S. Miltenyi, “*Characterization and Classification of Stem Cells*”. 2011: p. 149-167.
- (15) Nolte, J.A., *Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells*2006, St. Louis, MO, USA: Springer.
- (16) Francis, M.P., et al., *Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction*. Organogenesis, 2010. 6(1): p. 11-14.
- (17) Zuk, P.A., et al., *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies*. Tissue Engineering, 2001. 7(2): p. 211-228.
- (18) Padoin, A.V., et al., *Sources of processed lipoaspirate cells: influence of donor site on cell concentration*. Plast Reconstr Surg, 2008. 122(2): p. 614-8.

- (19) Richmond, A., *Handbook of microalgal culture : biotechnology and applied phycology* 2004, Oxford, UK: Blackwell Publishing, 566.
- (20) Benavides L., J.A., *Comportamiento de partición de  $\beta$ -ficoeritrina producida por *Porphyridium cruentum* en sistemas de dos fases acuosas*, in *División de Ingeniería* 2003, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey: Monterrey, Nuevo León, México. p. 76.
- (21) Austin, U.o.T.a. *Media List*. [cited 2012; Available from: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/media.aspx>.
- (22) Roman, R.B., et al., *Recovery of pure Bphycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum**. *Journal of Biotechnology*, 2002. 93(1): p. 73-85.
- (23) Pissuwan, D., et al., *In Vitro Cytotoxicity of RAFT Polymers*. *Biomacromolecules*, 2010. 11(2): p. 412-420.
- (24) Corporation, P., *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*, 2009, Promega Corporation: Wisconsin, USA. p. 13.
- (25) Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay*. *Analytical Biochemistry*, 1996. 239(1): p. 70-76.
- (26) Cohen, Z., *Chemicals from microalgae* 1999, Padstow, UK: Taylor&Francis Ltd. 419.
- (27) Bermejo, R., E.M. Talavera, and J.M. Alvarez-Pez, *Chromatographic purification and characterization of *Porphyridium cruentum* Semipreparative high-performance liquid chromatographic separation and characterization of its subunits*. *Journal of Chromatography A*, 2001. 917(1-2): p. 135-145.
- (28) Basaca-Loya, G.A., et al., *Extraction and purification of B-phycoerythrin from the red microalga *Rhodorus marinus**. *Ciencias Marinas*, 2009. 35(4): p. 359-368.
- (29) Ni, H., et al., *Optimization of acidic extraction of astaxanthin from *Phaffia rhodozyma**. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2008. 9(1): p. 51-9.
- (30) Ellison, S.L.R., et al., *Traceability in Chemical Measurement*, Eurachem, Editor 2003, Eurachem/CITAC: United Kingdom p. 43.
- (31) Safety, C.C.f.O.H. *What is an LD50 and LC50*. 2005; Page on <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html>.
- (32) Guerrero, J.L.G., et al., *Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum**. *Food Chemistry*, 2000. 70(3): p. 345-353.

## 7 AUTHORIZATIONS AND DISCLAIMER

“Authors authorize LACCEI to publish the papers in the conference proceedings. Neither LACCEI nor the editors are responsible either for the content or for the implications of what is expressed in the paper.”