



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ERITROPROTECTOR DE LAS FICOBILIPROTEÍNAS PROCEDENTES DE *Porphyridium cruentum*.

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

presenta:

RUBRIA LUCÍA PEÑA MEDINA

Hermosillo, Sonora, México

Enero de 2023

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 13 de enero del 2023.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada **Evaluación del potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum***, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de **Maestra en Biociencias**, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

ATENTAMENTE



Rubria Lucía Peña Medina

Nombre y Firma del Autor



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN
Abogado General
UNIVERSIDAD DE SONORA

Hermosillo, Sonora, México

Enero, 2023.

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ERITROPROTECTOR DE LAS
FICOBILIPROTEÍNAS PROCEDENTES DE *Porphyridium cruentum***

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN BIOCIENCIAS

Presenta:

RUBRIA LUCÍA PEÑA MEDINA

Hermosillo, Sonora, México.

13 de enero de 2023

APROBACIÓN

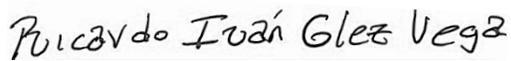
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada Evaluación del potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum* presentada por Rubria Lucía Peña Medina, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Biociencias.



Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña
Director



Dra. Diana Fimbres Olivarría
Co-directora/Secretaria



Dr. Ricardo Iván González Vega
Sinodal



Dr. Luis Rafael Martínez Córdova
Sinodal

DEDICATORIA

A mis papás, Nivardo y Rubria, que siempre creyeron en mí, y me enseñaron a hacerlo.

A mi abuelita, que con una mirada y pocas palabras es capaz de tocarme el alma.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS), al Posgrado en Biociencias, al Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (DIPA) y al Centro Universitario de la Ciénega, por el apoyo que posibilitó la realización del presente proyecto.

Al Dr. Ricardo Iván González Vega, por todas las noches en vela que pasamos trabajando, por las pláticas académicas y casuales. Por sembrar en mí la semilla de mí gusto por la investigación.

A la Dra. Diana Fimbres Olivarría, por estar siempre presente, por escucharme y su empatía hacia mí. Por su comprensión y cariño. Por mostrarme el maravilloso mundo de las algas.

Al Dr. José Antonio López Elías, que me contagió de su pasión por la Biología cuando fue mi profesor, por impulsar mi cambio de plan de estudios, y de vida. A mis sinodales internos, el Dr. Luis Fernando Enríquez Ocaña y el Dr. Luis Martínez Córdova, por sus observaciones precisas y sus esenciales aportaciones, por sus palabras de aliento.

A la Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez, Dr. Enrique Márquez Ríos y Dr. Miguel Ángel Robles García, por darme un espacio en sus instalaciones, por compartirme de sus materiales, reactivos y, por supuesto, sus enseñanzas. Por su ayuda genuina y desinteresada, por inspirarme a regresar ese gesto.

A Daniela, por las risas, las lágrimas y por trabajar a mi lado. Por siempre comprender y perdonar. Porque crecimos juntas.

A mis papás, Nivardo y Rubria, que me brindaron su amor y apoyo incondicional en cada decisión que tomé.

A Marylú, por las largas jornadas juntas, por ser mi confidente y amiga. Por sus enseñanzas del laboratorio, ciencia y vida. Por hablarme con el corazón.

RESUMEN

Existen múltiples asociaciones entre los diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD con la incidencia de enfermedades transmisibles y no transmisibles, como enfermedades cardiovasculares, determinados carcinomas y COVID-19. El tratamiento y prevención de estas enfermedades han sido orientados hacia el estudio de compuestos bioactivos capaces de combatir los efectos del estrés oxidativo. Las microalgas son una fuente de compuestos bioactivos prometedora, entre ellos las ficobiliproteínas (FBP): ficoeritrina (FE), ficocianina (FC) y aloficocianina (AFC), que destacan por sus diversas aplicaciones y actividades terapéuticas. La microalga *Porphyridium cruentum* sobresale por su alto contenido de FBP, compuestos bioactivos cuyo potencial eritroprotector no ha sido reportado. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum*. La microalga se cultivó en medio F/2 bajo condiciones controladas de laboratorio. Se determinó el día 10 cultivo como punto de cosecha, correspondiente a la fase estacionaria. Se liofilizó la biomasa microalgal y se procedió a realizar una extracción con metanol (MetOH), Tris HCl (T-HCl) y solución fisiológica (SF) asistida por ultrasonido. Se cuantificó por espectrofotometría la concentración de FBP en los extractos acuosos y de clorofilas y carotenoides totales en el extracto MetOH. Se evaluó la actividad antioxidante de los extractos con los métodos ABTS⁺, DPPH[•] y FRAP, con ellos se precisó que el principal mecanismo antioxidante de los extractos acuosos es el HAT y del MetOH el SET. Los resultados de los ensayos de inhibición de hemólisis inducida por AAPH, hipotonicidad y calor, revelaron una probable relación entre los diferentes antígenos (ABO y RhD) con el efecto antihemolítico. Este fenómeno formaliza la importancia de la creación de fármacos biodirigidos a un determinado grupo sanguíneo, con el fin de tratar y/o prevenir enfermedades.

ABSTRACT

There are multiple associations between the different blood groups of the ABO and RhD system with the incidence of communicable and noncommunicable diseases, such as cardiovascular diseases, certain carcinomas and COVID-19. The treatment and prevention of these diseases have been oriented towards the study of bioactive compounds capable of succumbing the oxidative stress effects. Bioactive compounds represent an alternative to prevent and counteract the oxidative stress effects. Microalgae are a promising source of bioactive compounds, including phycobiliproteins (PBP): phycoerythrin (PE), phycocyanin (PC) and allophycocyanin (APC), which stand out for their diverse applications and therapeutic activities. The microalga *Porphyridium cruentum* have a high content of PBP, bioactive compounds whose erythroprotective potential has not been reported. The aim of this study was to evaluate the erythroprotective potential of phycobiliproteins from *Porphyridium cruentum*. The microalga was cultured in F/2 medium under controlled laboratory conditions. It was determined the day 10 of culture as the harvest point, corresponding to the stationary phase. The microalgal biomass was lyophilized and a methanolic (MetOH), Tris HCl (T-HCl) and physiological solution (SF) extraction assisted by ultrasound was performed. The concentration of PBP in aqueous extracts and chlorophylls and total carotenoids in MetOH extract was quantified by spectrophotometry. The antioxidant activity of the extracts was evaluated with the ABTS⁺⁺, DPPH[•] and FRAP methods, with which it was specified that the main antioxidant mechanism of the aqueous extracts was HAT and MetOH was SET. The results of the AAPH, hipotonicity and heat induced hemolysis revealed a probable relationship between the different antigens (ABO and RhD) with the antihemolytic effect. This phenomenon formalizes the importance of the creation of drugs biodirected to a certain blood group, in order to treat and or prevent diseases.

ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	3
I.1. Grupos sanguíneos	3
I.1.1. Sistema ABO.....	4
I.1.2. Sistema Rh	5
I.1.3. Asociación entre los grupos sanguíneos (ABO y RhD) e incidencia de enfermedades	6
I.2. Microalgas	8
I.2.1. Biología de las microalgas	8
I.2.2. Importancia de las microalgas.....	9
I.2.3. <i>Porphyridium cruentum</i>	10
I.2.3.1. Clasificación taxonómica.....	10
I.2.3.2. Biología de <i>Porphyridium cruentum</i>	11
I.2.3.3. Caracterización química de <i>Porphyridium cruentum</i>	12
I.3. Compuestos bioactivos.....	14
I.3.1. Generalidades de los compuestos bioactivos	14
I.3.2. Compuestos bioactivos de <i>Porphyridium cruentum</i>	14
I.4. Estrés oxidativo	15
I.4.1. Especies reactivas.....	15
I.4.2. Sistemas antioxidantes	17
I.4.3. Hemólisis.....	19
I.4.3.1. Generalidades	19
I.4.3.2. Enfermedades asociadas a la hemólisis.....	20

I.4.3.3. Actividad antihemolítica.....	21
I.5. Ficobiliproteínas	23
I.5.1. Generalidades	23
I.5.2. Estructura	25
I.5.3. Características fisicoquímicas.....	27
I.5.4. Función de las ficobiliproteínas.....	29
I.5.5. Aplicaciones de las ficobiliproteínas	31
I.5.6. Actividades biológicas de las ficobiliproteínas.....	32
II. HIPÓTESIS	33
III. OBJETIVOS.....	34
III.1. Objetivo general.....	34
III.2. Objetivos particulares	34
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	35
IV.1. Obtención de la microalga roja <i>Porphyridium cruentum</i>	35
IV.2. Diseño experimental.....	35
IV.3. Cultivo y obtención de la biomasa de <i>Porphyridium cruentum</i>	35
IV.4. Concentración celular y cinética de crecimiento.....	37
IV.5. Extracción de ficobiliproteínas.....	38
IV.6. Cuantificación de pigmentos	39
IV.7. Determinación cuantitativa de proteínas	39
IV.8. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas.....	40
IV.8.1. Determinación de la actividad antioxidante	40
IV.8.1.1. Ensayo de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS ⁺).....	40
IV.8.1.2. Ensayo de inhibición del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH [•]).....	41
IV.8.1.3. Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP).....	41
IV.8.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea	42
IV.8.3. Evaluación del potencial eritroprotector	43
IV.8.3.1. Actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH)	43
IV.8.3.2. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad.....	44
IV.8.3.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor.....	44

IV.9. Análisis estadístico	44
V. RESULTADOS	46
V.1. Cinética de crecimiento	46
V.2. Cuantificación de pigmentos	46
V.3. Determinación cuantitativa de proteínas.....	47
V.4. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas	48
V.4.1. Determinación de la actividad antioxidante	48
V.4.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea.....	51
V.4.3. Evaluación del potencial eritroprotector.....	56
V.4.3.1. Determinación de la actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH).....	56
V.4.3.2. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad	61
V.4.3.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor	66
VI. DISCUSIÓN.....	71
VI.1 Cinética de crecimiento	71
VI.2. Cuantificación de pigmentos	72
VI.3. Determinación cuantitativa de proteínas	74
VI.4. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas	74
VI.4.1. Determinación de la actividad antioxidante	74
VI.4.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea	81
VI.4.2.1. Evaluación del potencial eritroprotector	82
VI.4.2.2. Actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH).....	83
VI.4.2.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad	85
VI.4.2.4. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor	86
VII. CONCLUSIONES	88
VIII. RECOMENDACIONES	89
IX. LITERATURA CITADA.....	90
X. APÉNDICE	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>P. cruentum</i>	11
Figura 2. Representación estructural de un fitocromo bacteriano.....	24
Figura 3. Principales tipos de ficobilinas.	26
Figura 4. Atenuación de la luz en diferentes ambientes marinos (modificada).	30
Figura 5. Representación esquemática del ficobilisoma en la membrana tilacoidal, cercano al fotosistema II (FSII) (modificada).	31
Figura 6. Escalamiento de <i>Porphyridium cruentum</i>	36
Figura 7. Conteos de <i>Porphyridium cruentum</i> en la microcámara de conteo de la cámara de Neubauer.....	38
Figura 8. Cinética de crecimiento de <i>P. cruentum</i> ($\log_2 \text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$).	46
Figura 9. Correlación de Pearson de los ensayos de FRAP y DPPH [•] del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.	49
Figura 10. Correlación de Pearson de los ensayos de FRAP y ABTS ^{•+} del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.	50
Figura 11. Correlación de Pearson de los ensayos de ABTS ^{•+} y DPPH [•] del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.	50
Figura 12. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO.....	52
Figura 13. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo A.	53
Figura 14. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo O.	54
Figura 15. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo AB.	55
Figura 16. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO.	57
Figura 17. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo A.	58

Figura 18. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo O..	59
Figura 19. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo AB..	60
Figura 20. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO..	62
Figura 21. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo A..	63
Figura 22. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo O..	64
Figura 23. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo AB..	65
Figura 24. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO..	67
Figura 25. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo A..	68
Figura 26. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo O..	69
Figura 27. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de <i>P. cruentum</i> sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo AB..	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Asociaciones entre la incidencia de enfermedades con los grupos sanguíneos del sistema ABO.	7
Tabla 2. Asociaciones entre la incidencia de enfermedades con los grupos sanguíneos del sistema RhD.	7
Tabla 3. Características fisicoquímicas de las FBP.	28
Tabla 4. Composición del medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962).	37
Tabla 5. Concentración de ficobiliproteínas de los extractos acuosos provenientes de <i>P. cruentum</i> (mg·g ⁻¹ PS).....	47
Tabla 6. Concentración de clorofilas y carotenoides totales del extracto metanólico de <i>P. cruentum</i> (mg·g ⁻¹ PS).....	47
Tabla 7. Concentración de proteína de los extractos acuosos provenientes de <i>P. cruentum</i> (μg·mL ⁻¹).....	48
Tabla 8. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de <i>P. cruentum</i> (μmol ET·g ⁻¹ PS).	49

INTRODUCCIÓN

Existen múltiples asociaciones entre los diferentes grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD con la incidencia de enfermedades, entre ellos distintos carcinomas (adenocarcinoma colorectal y de esófago, cáncer de mama, páncreas y de pulmón de células pequeñas), trastornos sanguíneos (trombosis), endócrinos (tiroxicosis), gestacionales (hipertensión gestacional) e infecciosas (COVID-19) (Ellinghaus *et al.*, 2020; Dahlén *et al.*, 2021; Reilly *et al.*, 2021). Su relevancia reside en la presencia de los antígenos A, B y H en la membrana de eritrocitos, pero también como glicoproteínas solubilizadas circundantes, en secreciones y excreciones, en la superficie de plaquetas, células epiteliales, endoteliales y neuronas (Glymiyarova *et al.*, 2019; Reilly *et al.*, 2021). El tratamiento y prevención de esas enfermedades ha sido orientada hacia el estudio de compuestos bioactivos capaces de combatir los efectos del estrés oxidativo (Pessoa *et al.*, 2019), el cual es definido como un desequilibrio entre los sistemas antioxidantes y las especies reactivas de azufre, carbonilo, nitrógeno y oxígeno (Mailloux *et al.*, 2016), clasificadas como radicales y no radicales (Nakai y Tsuruta, 2021).

Los radicales libres, o simplemente radicales, son especies químicas que poseen al menos un electrón desapareado en su último orbital de energía, producto de una ruptura homolítica (Phaniendra *et al.*, 2015). Los radicales libres pueden alterar componentes de la membrana celular de eritrocitos, particularmente a los fosfolípidos, lo que conduce a la hemólisis, inducida principalmente por radicales peroxilo y alcoxilo (Naparło *et al.*, 2020). La hemólisis implica la ruptura de la membrana celular de eritrocitos, liberando hemoglobina y otros constituyentes intracelulares al plasma (Siddon y Tormey, 2019). Cuando la hemólisis persiste, puede resultar en enfermedades hemolíticas y padecimientos relacionales al estrés oxidativo (Bozza y Jeney, 2020).

El estrés oxidativo desencadena acciones que afectan a biomoléculas importantes, incluyendo la degradación del ADN, la peroxidación lipídica y la proteólisis. El estrés oxidativo está asociado con diversas enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Sharifi-Rad *et al.*, 2020). Las enfermedades no transmisibles fueron la causa del 74% del total de las defunciones a nivel mundial en 2019, cifra que engloba

40.805 millones de muertes (WHO, 2020). Por ende, la intervención del sector salud en conjunto con las investigaciones asociadas al estrés oxidativo es de carácter urgente.

Los compuestos bioactivos representan una alternativa para prevenir y contrarrestar los efectos del estrés oxidativo (Pessoa *et al.*, 2019). Los océanos son una fuente prometedora de recursos naturales por su extensión, poca exploración y riqueza biológica (Patel *et al.*, 2013), incluyendo a las microalgas, un grupo polifilético de microorganismos acuáticos fotosintéticos que ha mostrado un excelente desempeño en la producción de compuestos bioactivos, entre ellos las ficobiliproteínas (FBP), que destacan por sus diversas aplicaciones y actividades terapéuticas (Alam *et al.*, 2020). *Porphyridium cruentum* figura como una excelente fuente de FBP, misma que es una microalga roja planctónica marina cosmopolita. Las FBP de *P. cruentum* se clasifican por sus características espectroscópicas como B-ficoeritrina (B-FE; $\lambda_{\max} = 545-565$ nm), R-ficocianina (R-FC; $\lambda_{\max} = 635-638$ nm) y aloficocianina (AFC; $\lambda_{\max} = 650-660$ nm) (Kannaujiya *et al.*, 2017; Queiroz *et al.*, 2020).

La demanda de nuevos compuestos bioactivos para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, infecciones microbianas y procesos inflamatorios (Mattioli *et al.*, 2018) justifica la importancia de la exploración de las actividades biológicas de las FBP no reportadas previamente, como es el caso de su potencial eritroprotector frente a la hemólisis. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial eritroprotector de las FBP extraídas de *P. cruentum*. Los resultados podrían contribuir al desarrollo de nuevos fármacos que inhiban los efectos del estrés oxidativo.

I. ANTECEDENTES

I.1. Grupos sanguíneos

Los grupos sanguíneos consisten en una combinación particular de antígenos sobre la superficie de eritrocitos en un individuo. Los antígenos son genéticamente hereditarios, ya sea por un solo gen o un grupo de dos o más genes homólogos estrechamente vinculados, cuyos fenotipos conforman los grupos de los sistemas sanguíneos, a los cuales serológicamente les corresponde un anticuerpo específico. Actualmente, hay 43 sistemas de grupos sanguíneos que contienen 345 antígenos para glóbulos rojos humanos reconocidos (Li y Guo, 2022).

Los antígenos del grupo sanguíneo se encuentran unidos a proteínas y glucoproteínas de superficie. La especificidad del sistema sanguíneo puede estar determinada por una secuencia de oligosacáridos (ABO) o de aminoácidos (Kell, Duffy, Kidd y MNS) (Smart *et al.*, 2020). Los antígenos con especificidad de sistema determinada por carbohidratos son productos génicos indirectos (ABO), cuyos genes codifican un producto intermedio, generalmente una enzima que crea la especificidad antigénica al transferir moléculas de azúcar a una proteína o lípido. Por otra parte, los antígenos definidos por proteínas son productos génicos directos, de especificidad determinada por una secuencia de aminoácidos heredada y/o la conformación de la proteína (Regan *et al.*, 2017).

Se ha acumulado una gran cantidad de datos serológicos, genéticos y bioquímicos sobre los antígenos de los glóbulos rojos, con funciones biológicas que recién han sido dilucidadas. Pocos de estos antígenos son específicos de eritroides, como el Rh, ya que la mayoría pueden estar presentes en diferentes células humanas (Regan, 2017). Las funciones que dependen de la estructura de los tipos sanguíneos pueden asociar a los antígenos con enfermedades y salud (Abegaz, 2021). Entre los sistemas sanguíneos, el ABO y Rh son los de mayor importancia clínica (Regan, 2017).

I.1.1. Sistema ABO

Los antígenos del sistema ABO exhiben fenotipos alternativos de estructuras glucoconjugadas que se encuentran en la superficie celular y cumplen un rol activo en la fisiología y patología de las células (Abegaz, 2021). Los epítomos del sistema ABO estriban en azúcares unidos a polipéptidos o esfingolípidos, es decir, glicoproteínas o glicolípidos (de-Mattos 2016; Regan, 2017). La expresión del grupo sanguíneo del sistema ABO es codificada por el gen 9q34.1 (Liu y Wang, 2022).

El sistema ABO es caracterizado por presentar el antígeno H (fucosa) como sustrato, el cual puede contar con la presencia o ausencia de dos antígenos (A y B) en la membrana de los glóbulos rojos y tres anticuerpos regulares (Anti-A; anti-B; anti-A y anti-B) en el plasma sanguíneo (de-Mattos, 2016). Esto da lugar a cuatro grupos sanguíneos (A, B, AB y O) y son también conocidos como sistema histo-grupos sanguíneos. Los antígenos del sistema ABO están formados por azúcares unidos a la ceramida que se encuentra en la membrana de los eritrocitos. Los azúcares terminales de cada grupo sanguíneo son: A (acetilgalactosamina + fucosa), B (galactosa + fucosa), O (fucosa) y AB (acetilgalactosamina + fucosa; galactosa + fucosa) (Cuéllar-Cruz, 2021; Liu y Wang, 2022). Los antígenos de grupos sanguíneos definidos por carbohidratos están respaldados en la membrana de los glóbulos rojos por proteínas transmembrana. La banda 3 (transporte de aniones) y Glut-1 (transporte de glucosa) respaldan la mayoría de los determinantes de carbohidratos del sistema ABH (Daniels, 2013).

Los antígenos ABO, ABO(H) o A, B y H, son referidos como antígenos del grupo histo-sanguíneo, debido a que se encuentran globalmente distribuidos por el cuerpo; evolucionaron inicialmente en el tejido ectodérmico y endodérmico, y ulteriormente, en los glóbulos rojos y las células hematopoyéticas (Liu y Wang, 2022). Los antígenos A, B y H pueden encontrarse en la superficie de eritrocitos, leucocitos, plaquetas, neuronas, células epiteliales y endoteliales, como proteínas plasmáticas y enzimas de superficie, además de estar presentes en secreciones (saliva, leche materna, fluido seminal, secreciones gástricas y líquido amniótico) y excreciones (sudor y orina) (Glymiyarova *et al.*, 2019; Abegaz, 2021; Reilly *et al.*, 2021).

La distribución de los cuatro grupos sanguíneos varía en las diferentes poblaciones del mundo, el grupo O es el más frecuente, seguido del grupo A, grupo B y grupo AB (Cuéllar-

Cruz, 2021). Asociado a ello, el fenotipo O es común entre los nativos africanos y sudamericanos, mientras que A y B son comunes en los países del norte de Europa y Asia, respectivamente (de-Mattos, 2016). Existe otro sistema sanguíneo limitado a una distribución racial y poblacional, el RhD, el cual es fundamental para la comprensión de la herencia y los patrones de migración de los seres humanos, con significancia médica y clínica (Golassa *et al.*, 2017; Canizalez-Román *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2018a; Sabir *et al.*, 2021).

I.1.2. Sistema Rh

El sistema de grupo sanguíneo Rh, anteriormente conocido como sistema Rhesus, es un sistema sanguíneo complejo, cuyos grupos sanguíneos son codificados bajo codominancia por los genes RHD y RHCE, localizados en el cromosoma 1 (1p36.11), los cuales pueden dar lugar a varias combinaciones de antígenos (C, c, E, e, D y alrededor de 50 antígenos más), cuya expresión depende de la proteína RhAG, ya que con ella los antígenos forman un complejo nuclear y a su vez, interactúan con proteínas esenciales para la integridad del eritrocito. A diferencia del sistema ABO, los antígenos Rh están presentes en la superficie de glóbulos rojos. Los principales antígenos Rh son el D y C, estos son heredados como un grupo genéticamente vinculado, conocido como haplotipo, ya que existen dos posibles opciones para la expresión del antígeno D (D-positivo o D-negativo) y cuatro posibles opciones para la expresión de los antígenos expresados por el gen RHCE (ce, Ce, cE y CE), los cuales presentan epítomos particulares que se encuentran anclados a lipoproteínas transmembranales (Regan, 2017; van-der-Schoot *et al.*, 2018; Vege y Westhoff, 2019).

Después del sistema ABO, el sistema Rh ocupa el segundo lugar en importancia clínica, en virtud a la alta inmunogenicidad de los antígenos Rh, especialmente el D (RH1), el cual es portador de la proteína RhD, codificada a su vez por el gen RHD (NG_007494). La presencia o ausencia del antígeno D representa el principal punto de clasificación de los grupos sanguíneos del sistema Rh, y confiere el estado Rh positivo o Rh negativo, respectivamente (van-der-Schoot *et al.*, 2018; Vege y Westhoff, 2019). Los individuos categorizados como Rh positivos presentan los antígenos RHD y RHCE, mientras que los eritrocitos Rh negativos sólo tienen RHCE. El antígeno D tiene una prevalencia del 85% en caucásicos, 92% en negros y 99% en

asiáticos/americanos nativos (van-der-Schoot *et al.*, 2018). El antígeno D del sistema Rh está formado por un grupo de epítomos anclados a la proteína RhD (Sabir *et al.*, 2021).

I.1.3. Asociación entre los grupos sanguíneos (ABO y RhD) e incidencia de enfermedades

Los sistemas de grupos sanguíneos ABO y Rh están asociados con múltiples enfermedades, incluidas enfermedades cancerosas, infecciosas, no infecciosas, bacterianas y virales (Rana *et al.*, 2021). En el caso del sistema sanguíneo ABO, esto puede ser explicado porque los antígenos A y B están presentes no solo en las células eritroides sino también en muchos otros tejidos y, debido a la diversidad de tejidos, la expresión puede dar lugar a diferencias en la aparición de enfermedades (Harmening, 2012), por otro lado, los vínculos entre el grupo sanguíneo RhD y los resultados de salud no están claros y se han estudiado mucho menos en el entorno de cuidados intensivos que el grupo sanguíneo ABO (Abegaz *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2021). Estas asociaciones entre enfermedades con los grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD se resumen en la Tabla 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Asociaciones entre la incidencia de enfermedades con los grupos sanguíneos del sistema ABO.

Grupo ABO	Enfermedad asociada	Fuente
A	Cáncer de mama	Meo <i>et al.</i> , 2017; Payandeh <i>et al.</i> , 2015
	Cáncer de páncreas	El-Jellas <i>et al.</i> , 2017
	COVID-19	Ellinghau <i>et al.</i> , 2020
	Colelitiasis	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Trombosis (embolismo pulmonar y trombosis de vena profunda)	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	SARS	Reilly <i>et al.</i> , 2021
B	Cáncer de páncreas	El-Jellas <i>et al.</i> , 2017
	Trastornos sanguíneos (úlcera gástrica y úlcera duodenal)	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Cáncer de tiroides	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Diabetes mellitus tipo 2	Getawa <i>et al.</i> , 2022
O	Tirotoxicosis	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Hipertensión gestacional	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Cálculos renales y ureterales	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Trastornos sanguíneos (úlcera gástrica y duodenal)	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
AB	Carcinoma escamoso de esófago	Chen <i>et al.</i> , 2021
	Colelitiasis	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Cáncer de tiroides	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	Cáncer colorrectal	Al-Sawat <i>et al.</i> , 2022

Tabla 2. Asociaciones entre la incidencia de enfermedades con los grupos sanguíneos del sistema RhD.

RhD	Enfermedad asociada	Fuente
Positivo	Cáncer de mama	Payandeh <i>et al.</i> , 2015; Meo <i>et al.</i> , 2017
	Hipertensión gestacional	Dahlén <i>et al.</i> , 2021
	COVID-19	Anderson <i>et al.</i> , 2022
Negativo	Cáncer de pulmón de células pequeñas	Biswas <i>et al.</i> , 2018

I.2. Microalgas

I.2.1. Biología de las microalgas

Las microalgas son un grupo polifilético de microorganismos unicelulares acuáticos fotosintéticos (Tsaloglou, 2016). Tradicionalmente incluyen al phylum Cyanobacteriae (dominio Bacteria) y miembros del reino Protista (dominio Eukarya) (Ejike *et al.*, 2017). Con base en su clasificación filogenética, las microalgas protistas se pueden categorizar en los supergrupos Archaeplastida (Glaucophyta, Rhodophyceae, Chloroplastida), Chromalveolata (Cryptophyceae, Haptophyta, Stramenopiles, Alveolata), Rhizaria (Chlorachniophyta) y Excavata (Euglenozoa) (Adl *et al.*, 2005; Ruggiero *et al.*, 2015), omitiendo en algunos casos al phylum Cyanobacteriae, dependiendo del autor (Borowitzka, 2018).

Las algas son un consorcio altamente diverso de linajes ancestrales a la mayoría de los organismos fotoautótrofos contemporáneos, integrado por micro y macroalgas. No es un grupo taxonómico, pero tiene utilidad práctica, ya que incluye a organismos fotosintéticos que, a diferencia de las plantas terrestres, no producen un embrión para dejar descendencia (Krienitz, 2009; Tsaloglou, 2016; Borowitzka, 2018). Las algas se suelen dividir en macro y microalgas, estas últimas están definidas como microorganismos unicelulares acuáticos fotosintéticos (Tsaloglou, 2016); con 72,600 especies representan el 70% de las especies de algas registradas a nivel mundial, posicionándose como los organismos más abundantes en ambientes acuáticos (Guiry y Guiry, 2019). Según su hábitat pueden ser planctónicas, es decir, que se encuentran suspendidas en la columna de agua, o bentónicas, las cuales viven asociadas a un sustrato (Khan *et al.*, 2018).

Las microalgas son fotosintéticas, por lo que la energía solar y nutrientes inorgánicos como el fósforo, el nitrógeno y el dióxido de carbono, son elementales para sintetizar complejos orgánicos, como los ácidos nucleicos, carbohidratos, lípidos y proteínas (Tsaloglou, 2016). Un carácter de inclusión al grupo es la presencia de clorofila α , factor que excluye a bacterias que poseen otros pigmentos fotosintéticos (Alam *et al.*, 2020). La diversidad de complejos antena microalgales les permite absorber energía dentro de un amplio rango de longitud de onda, el cual abarca de los 400 a 700 nm, y es conocido como radiación fotosintéticamente activa (PAR) (Li *et al.*, 2019). En virtud de ello, son capaces de sobrevivir en diferentes profundidades del

océano y otros cuerpos de agua. Algunas microalgas responden a cambios de calidad lumínica, incrementando la proporción de determinado pigmento según el espectro de absorción complementario a la disponibilidad de luz (Kavitha *et al.*, 2016).

I.2.2. Importancia de las microalgas

Las microalgas obtienen energía química a través de la fotosíntesis oxigénica, por lo que emplean agua, dióxido de carbono y energía lumínica para la formación de dos productos esenciales que sustentan la vida en el planeta: el oxígeno molecular y la materia orgánica (Larkum, 2016; Junge, 2019). La síntesis de oxígeno microalgal dio pie a la biodiversidad de la tierra, aunado a que las microalgas, específicamente las cianobacterias, se consideran los organismos más ancestrales (Chapman, 2013; Larkum, 2016). Se estima que más del 50% del oxígeno molecular atmosférico proviene de las microalgas (Chapman, 2013). Dentro de este contexto, son fundamentales en el ciclo de carbono, ya que asimilan aproximadamente el 50% de dióxido de carbono de la Tierra. Además, tienen un papel importante en el ciclo del nitrógeno por su labor como fijadores de nitrógeno molecular, función desempeñada por las cianobacterias, principalmente las heterocísticas (Borowitzka, 2018). El segundo producto mencionado, la materia orgánica, las sitúa como los productores unicelulares primarios más abundantes que se encuentran en los sistemas acuáticos. Por añadidura, son entidades primordiales para la pesca y la acuicultura (Chisti, 2018).

Una ventaja biotecnológica trascendental de las microalgas es la relación directa que guarda su composición química con las condiciones de su cultivo, como la temperatura, salinidad, iluminación, pH, dióxido de carbono, composición mineral, densidad de población, fase de crecimiento y otros aspectos fisiológicos (Benavente-Valdés *et al.*, 2016; Nwoba *et al.*, 2020). Del mismo modo, tienen la capacidad de producir compuestos bioactivos bajo condiciones ambientales estresantes (Gaignard *et al.*, 2019), entre ellos las proteínas, lípidos, polisacáridos y diversos micronutrientes (Nazih y Bard, 2018).

Las especies del género *Porphyridium* gozan de una posición económicamente privilegiada, aunada a su ciclo de vida corto y un alto rendimiento por unidad de área cultivada (Huang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2019). La clasificación del género *Porphyridium* ha suscitado

controversia en la comunidad científica (Ardiles *et al.*, 2020). Algunos estudios establecen la distinción de las especies *P. cruentum*, *P. aerugineum*, *P. sordidum*, *P. griseum*, *P. marinum* y *P. violaceum* como integrantes del género *Porphyridium* (Li *et al.*, 2019). Por otra parte, ciertos autores difieren, aseverando sinonimia entre las especies *P. cruentum*, *P. marinum* y *P. purpureum*, así como entre *P. violaceum* y *Rhodella violacea* (Guiry y Guiry, 2021). Las diferencias de las especies mencionadas proceden de su composición de cloroplastos y ficobilisomas (Ott, 1987), la localización y variedad de organelos (Neushul, 1970) y su composición fisicoquímica (Ardiles *et al.*, 2020; Medina-Cabrera *et al.*, 2020). No obstante, es un aspecto que aún no ha sido dilucidado. De cualquier forma, *P. cruentum* es la especie más recurrentemente utilizada en trabajos de investigación (Ardiles *et al.*, 2020).

En las últimas décadas, *P. cruentum* ha sido foco de atención debido a su capacidad de sintetizar una diversa gama de compuestos bioactivos, como exopolisacáridos (EPS), ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) y ficobiliproteínas (FBP); que tienen un gran potencial en alimentos, medicamentos y nutrición (Vasileva e Ivanova, 2019) lo que hace fundamental la realización de estudios relacionados a la optimización de su cultivo, así como a la extracción y purificación de sus compuestos bioactivos y la evaluación de sus actividades terapéuticas.

I.2.3 Porphyridium cruentum

I.2.3.1. Clasificación taxonómica

Dominio Eukarya

Reino Protista

Phylum Rodophyta

Clase Porphyridiophyceae

Orden Porphyridiales

Familia Porphyridiaceae

Género *Porphyridium*

Especie *P. cruentum*

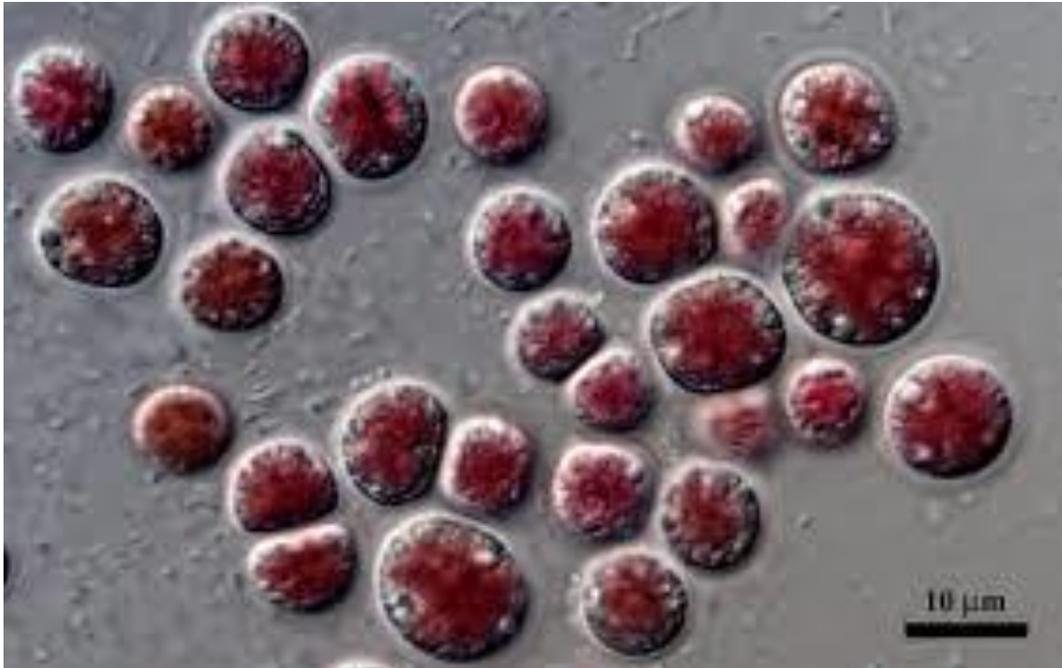


Figura 1. Células de *P. cruentum*.

Obtenida de: <https://algaeresearchsupply.com/products/copy-of-algae-culture-porphyridium-cruentum>

I.2.3.2. Biología de *Porphyridium cruentum*

P. cruentum es una microalga roja planctónica, miembro primitivo de la división Rodophyta del orden Porphyridiales. Se suelen encontrar en agua marina y suelos húmedos. Las células pueden ser solitarias o agruparse en colonias (Li *et al.*, 2019).

Su morfología celular es esférica, con un diámetro de 4 a 9 μm . No presenta pared celular, pero su membrana plasmática está rodeada por una membrana externa, compuesta de polisacáridos solubles en agua secretados por la célula, conocidos como exopolisacáridos (EPS) (Chang *et al.*, 2015). Los EPS están conformados por residuos de azúcar unidos covalentemente a grupos sulfatos y péptidos, por lo que son nombrados polisacáridos sulfatados (Kannaujiya *et al.*, 2017). Existe una adhesión mutua entre la membrana plasmática y la membrana externa, generando variación morfológica (Chang *et al.*, 2015).

La célula de *Porphyridium* está conformada por diferentes orgánulos, entre ellos la mitocondria, el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y el núcleo (de Jesus-Raposo *et al.*,

2013). La capa externa de la membrana nuclear de *P. cruentum* está cubierta por ribosomas. El nucléolo se encuentra en la región del núcleo de manera adyacente al cloroplasto. Tiene una doble membrana de plastidios en forma de estrella con lóbulos en la periferia de la célula. Todas las microalgas rojas comparten el aparato de Golgi del resto de las células eucariotas y es el lugar de síntesis de EPS para el género *Porphyridium*. Los gránulos de almidón, también llamados almidón florideano o fitoglucógeno, suelen estar presentes en el citoplasma y localizados entre los diferentes componentes celulares. Las mitocondrias tienen crestas aplanadas y se encuentran principalmente cerca de los dictiosomas, una pila de sacos del aparato de Golgi, en la periferia de la célula (Martín-Ortega y Segura-Campos, 2018). Presenta un cloroplasto en forma de estrella, y comprende aproximadamente el 60% del espacio celular (de Jesus-Raposo *et al.*, 2013). En la membrana interna de los cloroplastos se encuentran los tilacoides, los cuales a su vez están protegidos por la membrana tilacoidal que resguarda en su interior la clorofila, mientras que anclada a ella se encuentran los ficobilisomas, que se definen como complejos multiproteicos accesorios fotosintéticos (Gallego *et al.*, 2019) Los ficobilisomas están constituidos exclusivamente polipéptidos enlazantes y FBP (Li *et al.*, 2019), estos últimos son considerados compuestos bioactivos muy importantes de la especie (Vonshak *et al.*, 1985).

I.2.3.3. Caracterización química de *Porphyridium cruentum*

La composición química proximal de la biomasa en peso seco de *P. cruentum* está determinada por un 13.89% \pm 0.17 de carbohidratos, 14.67% \pm 0.24 de lípidos y 42.90% \pm 1.84 de proteína (media \pm desviación estándar) (Ardiles *et al.*, 2020). Por otra parte, el contenido de cenizas se ha reportado con una concentración de 23.59 mg por cada 100 g de biomasa seca de la especie, constituidas principalmente por sodio, calcio, potasio, magnesio y fósforo (di-Lena *et al.*, 2020).

Los carbohidratos sulfatados son el tipo más abundante de carbohidratos de *P. cruentum*, encontrados como EPS, y su concentración puede variar de acuerdo con sus condiciones de cultivo (Reboloso-Fuentes *et al.*, 2000; Mutmainnah *et al.*, 2018). Están constituidos principalmente por xilosa (38%), glucosa (24%), galactosa (22%) y ácido glucurónico (10%), así como trazas de arabinosa, ramnosa y manosa (López-Hernández *et al.*, 2020).

La fracción lipídica de la microalga consiste en 45% de lípidos neutros, 15.5% de glicolípidos y 60.5% de fosfolípidos polares (Safi *et al.*, 2013). Su perfil lipídico incluye ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), PUFA y HUFA. El ácido palmítico es el más abundante, representando 34.11% del total de ácidos grasos, seguido del ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentanioco (EPA) y ácido linoleico (AL), representando un 29.12%, 15.88% y 10.54% de los ácidos grasos totales, respectivamente (di-Lena *et al.*, 2020). Otros lípidos importantes son los carotenoides, pigmentos cuya variedad engloba a la E-zeaxantina (94.25 ± 0.90 mg), (9Z)-zeaxantina (9.51 ± 0.47 mg), (13Z)-zeaxantina (3.48 ± 0.24 mg), β -criptoxantina (6.51 ± 0.20 mg) y β -caroteno (53.41 ± 0.29 mg), concentraciones correspondientes por cada 100 g de biomasa seca (di-Lena *et al.*, 2019). La clorofila α es la única clorofila encontrada en la especie (di-Lena *et al.*, 2019), fenómeno común de las algas rojas (Takaichi, 2011).

El contenido proteico de *P. cruentum* está conformado principalmente por las FBP, así como proteínas ligadas a EPS, proteínas de membrana, proteínas libres y enzimas. Los aminoácidos constituyentes de la especie constan de 61% de aminoácidos no esenciales y 39% de aminoácidos esenciales (Smyth *et al.*, 2006; Lorenzen *et al.*, 2017), de este último grupo destacan por su alta concentración la treonina, valina, metionina, leucina, fenilalanina, histidina, arginina y triptófano, por lo que se considera un perfil de aminoácidos valioso (Mogany *et al.*, 2020). Se ha establecido que las FBP son los pigmentos de *P. cruentum* de mayor abundancia y relevancia, con proporciones de ficoeritrina (FE) ($2020 \text{ mg} \pm 391$), ficocianina (FC) ($262 \text{ mg} \pm 70$) y aloficocianina (AFC) ($216 \text{ mg} \pm 54$) por cada 100 gramos de biomasa seca (Rebollos-Fuentes *et al.*, 2000). Las FBP presumen una enorme gama de aplicaciones, entre ellas sobresale su excelente desempeño como compuestos bioactivos (Kannaujiya *et al.*, 2020).

I.3. Compuestos bioactivos

I.3.1. Generalidades de los compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son sustancias capaces de generar distintas actividades biológicas que otorgan beneficios a la salud, ya sea por sus actividades terapéuticas o por ventajas fisiológicas; pueden ser derivados de un procesamiento o naturales (Agustini y Kusmiati, 2017). Los océanos son una fuente de recursos naturales muy prometedora, de hecho, es considerada la de mayor riqueza y menor exploración, y representa aproximadamente el 70% de la superficie terrestre (Patel *et al.*, 2013). Por su distintivo rol en la producción sostenible de múltiples compuestos bioactivos, uno de los organismos marinos que ha sido foco de atención son las microalgas. Estos pueden ser empleados para la formulación de fármacos, cosméticos, aditivos e ingredientes alimentarios. Algunos de ellos son los ácidos grasos, clorofilas, carotenoides, vitaminas y FBP (Alam *et al.*, 2020).

I.3.2. Compuestos bioactivos de *Porphyridium cruentum*

P. cruentum es considerada como un reservorio de diversos productos de alto valor (Feller *et al.*, 2015), entre ellos, sus compuestos bioactivos, los cuales engloban a los carotenoides, las FBP, PUFA y EPS, cuyos métodos óptimos de extracción aún no están completamente dilucidados (Feller *et al.*, 2018). A pesar de ello, su cosecha es menos problemática que otros miembros del orden Porphyridiales, ya que tienden a la autofloculación, especialmente sometidas a bajo pH e irradiancias altas (Durmaz *et al.*, 2007), lo que facilita la obtención de sustancias de interés.

Se ha demostrado que los EPS de la especie generan efectos benéficos a la salud, por sus diferentes actividades biológicas: antioxidante, anticoagulante, antitrombótica, anticancerígena, antitumoral, inmunomoduladora y neuroprotectora (Hentati *et al.*, 2020). Adicionalmente, la especie cuenta con una sobresaliente concentración de enzima superóxido dismutasa, importante por su capacidad antioxidante (López-Hernández *et al.*, 2020). Las clorofilas y los carotenoides tienen la función celular de captar y transferir energía, además, ambos pigmentos presentan mecanismos de actividad antioxidante (Takaichi, 2013; Pérez-Gálvez *et al.*, 2020), sin embargo,

en la microalga roja *P. cruentum* se encuentran en concentraciones considerablemente menores, en contraste con las FBP (Durmaz *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2019).

Las FBP resaltan en el campo de la medicina por las actividades biológicas que ejercen, entre ellas la inmunomoduladora, anticancerígena, antitumoral, antiproliferativa, antiinflamatoria, antirradicalaria y antioxidante (Kannaujiya *et al.*, 2021; Palmer *et al.*, 2021), las cuales, están involucradas en la mitigación y prevención de los efectos del estrés oxidativo, que tiene repercusiones cruciales sobre la salud humana (Xia *et al.*, 2021).

I.4. Estrés oxidativo

La definición clásica de estrés oxidativo se refiere a una perturbación entre los sistemas antioxidantes y la exposición prooxidante (Sies, 1985). Contemporáneamente, se conceptualiza como un desbalance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, lo que conduce a la alteración de la señalización y control redox y/o daño molecular (Sies y Jones, 2007), de manera general, por el incremento de la síntesis de especies reactivas (Cortese-Krott *et al.*, 2017).

I.4.1. Especies reactivas

Las especies reactivas son especies químicas inestables, caracterizadas por su facilidad del flujo de electrones desde y hacia átomos, iones o moléculas. Como consecuencia, un átomo particular sufre un cambio en su estado de oxidación o número de oxidación (Villamena, 2017). Están clasificadas como especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN), especies reactivas de carbonilo (ERC) y especies reactivas de azufre (ERA) (Yamasaki *et al.*, 2019), categorizadas como radicales y no radicales (Phaniendra *et al.*, 2015). Los radicales libres, o simplemente radicales, son especies químicas que poseen al menos un electrón desapareado en su último orbital de energía, generalmente con gran poder reactivo y una vida media corta. Se pueden originar por la transferencia de electrones, pérdida de protones o ruptura homolítica de enlaces covalentes (Ceballos *et al.*, 2021).

Las fuentes de especies reactivas se pueden compendiar en dos grupos: extracelulares e intracelulares. Las extracelulares se dividen en agentes exógenos (radiación ionizante y fotoquímica, iones metálicos o del grupo hemo), enzimas de membrana (NADPH oxidasas y óxido nítrico sintasa endotelial) y enzimas citosólicas (xantina oxidasa, aldehído oxidasa, ciclooxigenadas y óxido nítrico sintasa inducible y neuronal). Por otro lado, las fuentes endógenas residen en reacciones enzimáticas efectuadas en mitocondria, lisosomas, microsomas, peroxisomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Abdal-Dayem *et al.*, 2017; Villamena, 2017).

Las especies reactivas operan como reguladores de diversas funciones celulares, entre ellas la maduración celular adecuada, incluyendo el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, así como la apoptosis (Carvajal-Carvajal, 2019); además, participan directamente en la eliminación de células cancerosas, en la desintoxicación de xenobióticos mediante el citocromo P450, en la producción de ATP mitocondrial, en la activación de factores de transcripción nuclear y cumplen con un rol de señalizadores intra e intercelulares (Parcheta *et al.*, 2021).

Las ERO son particularmente indispensables en el proceso inflamatorio. El incremento de la producción de ERO por parte de las células inmunes conlleva al desencadenamiento de eventos de señalización intracelular, estos pueden resultar en la activación del inflammasoma y la producción de citoquinas proinflamatorias mediante el reconocimiento de Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) y Patrones Moleculares Asociados a Daños (DAMP, por sus siglas en inglés) (Sikora *et al.*, 2021). Las ERO son moléculas señalizadoras que intervienen en la regulación de las respuestas de neutrófilos durante el cebado, desgranulación y formación de trampas extracelulares de neutrófilos y apoptosis. También participan en respuestas inmunes innatas, como la fagocitosis, proceso en el que se sintetizan ERO en vacuolas fagocíticas llamadas fagosomas, y en conjunto con los iones y enzimas hidrolíticas ácidas lisosomales (proteasas, sulfatasas, nucleasas, lipasas, fosfatasas y glicosidasas), actúan como intervinientes directos en la destrucción microbiana; sin embargo, su liberación hacia un ambiente extracelular puede causar daño tisular en el sitio de infección (Zeng *et al.*, 2019; Trivedi *et al.*, 2020). En ese mismo sentido, la activación errónea de citoquinas, quimoquinas y auto-anticuerpos de parte de los neutrófilos es propia de

enfermedades inflamatorias, contribuyendo a la inflamación y daño del tejido (Glennon-Alty *et al.*, 2018).

El exceso de enzimas y iones lisosomales, ERO así como una disfunción mitocondrial son persistentes en enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, respuestas inmunes anómalas, síndromes metabólicos y tumores, impulsando la patología inflamatoria de estas afecciones (Chen *et al.*, 2018). Además de las respuestas inmunes innatas, la sobreproducción de ERO puede ser resultado de alteraciones de múltiples procesos biológicos, como la fosforilación oxidativa, los iones de metales de transición, la actividad oxidasa, el plegamiento de proteínas, la timidina y el catabolismo de las poliaminas (Snezhkina *et al.*, 2019). Dichas acciones fomentan el estrés oxidativo, el cual está asociado con el desarrollo de enfermedades transmisibles, como la enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19) (Forcados *et al.*, 2021), y enfermedades no transmisibles, como las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Ivanov *et al.*, 2017; Seyedsadjadi y Grant, 2020). Dirigidos a la disminución del impacto del estrés oxidativo desencadenado por las ERO, los antioxidantes promueven la recuperación de la homeostasis (Tan *et al.*, 2018).

I.4.2. Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes o concretamente antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de moléculas biológicamente relevantes con el fin de mantener a las células en un estado redox más reducido (Henriksen, 2019). Su mecanismo de acción involucra su reactividad directa con los RL, fenómeno denominado actividad antirradicalaria, así como su capacidad de eliminación de RL, cualidad designada como actividad antioxidante, propiedad antioxidante, capacidad antioxidante y/o poder antioxidante (Brainina *et al.*, 2019). La eficiencia de los antioxidantes y la capacidad de inactivación de los RL están condicionadas principalmente por la energía de disociación de enlaces y el potencial de ionización (Manirafasha *et al.*, 2016).

Existen dos estrategias de inactivación de los RL: la reacción de transferencia de electrones (SET, por sus siglas en inglés) y la reacción de transferencia de átomos de hidrógeno

(HAT, por sus siglas en inglés). Ambas son el principio para la clasificación de los métodos de determinación de actividad antioxidante (Siddeeg *et al.*, 2021).

Los métodos basados en SET detectan la capacidad de un antioxidante potencial para transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, incluidos metales, carbonilos y radicales. Las reacciones SET suelen ser colorimétricas, es decir, exhiben un cambio de color correspondiente a la reducción del agente oxidante (Apak *et al.*, 2016; Gulcin, 2020). Algunos de los métodos existentes para la evaluación de las reacciones SET son los ensayos Folin-Ciocalteu, FRAP (poder de reducción antioxidante del ión férrico) y CUPRAC (capacidad antioxidante sobre el cobre) (Sun *et al.*, 2017).

Las técnicas fundamentadas por HAT miden la capacidad de un antioxidante para neutralizar los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno. En las reacciones HAT, la energía de disociación del enlace del grupo donante de hidrógeno y la energía de ionización del antioxidante candidato son los principales atributos que influyen su reactividad relativa. Las reacciones son generalmente rápidas, dependiendo del solvente y del pH de trabajo (Apak *et al.*, 2016; Gulcin, 2020). Regularmente implican el uso de una sonda fluorescente que puede reaccionar con los RL o con los antioxidantes; por lo tanto, la actividad antioxidante se puede determinar a partir de la cinética de competencia entre ambos compuestos, midiendo la curva de decaimiento de la fluorescencia de la sonda, en ausencia y presencia de un antioxidante, integrando el área bajo estas curvas. Estas técnicas incluyen los ensayos ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno), TRAP (parámetro antioxidante de captura de radicales), TOSC (capacidad de barrido de oxorradicales totales) y blanqueamiento Crocin (Sun *et al.*, 2017).

Los ensayos mixtos generalmente involucran el secuestro de un radical cromatóforo o fluoróforo por antioxidantes en los cuales intervienen los mecanismos HAT y SET en magnitud variable, dependiendo de las condiciones de reacción. Entre los principales ensayos mixtos se encuentran las técnicas de ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y DMPD^{•+} (dicloridrato de N, N-dimetilpfeñilendiamin) (Apak *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2017).

Los datos obtenidos a través de protocolos para la determinación de actividad antioxidante con base en los mecanismos HAT y SET aportan información sobre su potencial antioxidante intrínseco frente a los radicales libres, fenómeno relevante, puesto que la incidencia de procesos degenerativos está correlacionada con el superávit de radicales libres (Munteanu y Apetrei, 2021). La biodisponibilidad, biocompatibilidad y, en algunos casos, la capacidad de penetrar la barrera hematoencefálica, son factores elementales en la evaluación de los antioxidantes candidatos conducidos hacia el tratamiento y prevención de enfermedades (Jadhav *et al.*, 2018; Naparło *et al.*, 2020). Resulta crucial que los antioxidantes candidatos sean inertes y biocompatibles con las células y componentes sanguíneos (Jadhav *et al.*, 2018), particularmente los eritrocitos, ya que son las células sanguíneas más abundantes ($4-6 \times 10^6$ células $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), parte, debido a su rigidez, son altamente propensos a la ruptura de la membrana celular y hemólisis (Weber *et al.*, 2018).

I.4.3. Hemólisis

I.4.3.1. Generalidades

Los eritrocitos son células anucleadas de morfología bicóncava, consideradas el tipo más común de células sanguíneas, con una edad media de 120 días. Están encargadas del transporte de oxígeno y nutrientes a tejidos corporales a través de la sangre (Ingley, 2020). Son extremadamente vulnerables al daño oxidativo debido a la alta concentración celular de oxígeno, hemoglobina y PUFA de membrana. Están sometidas a un estrés continuo, acuñado a los ciclos de oxigenación y desoxigenación, fuerzas de cizallamiento en los vasos sanguíneos estrechos y los efectos de las ERO endógenas (Rebuglio-Velloso *et al.*, 2017).

El oxígeno molecular y el hierro son dos importantes precursores de las ERO endógenas, y a la vez, son los elementos conformacionales de la hemoglobina (Tsamesidis *et al.*, 2020; Webb *et al.*, 2022). La oxidación de la hemoglobina conduce a la formación de metahemoglobina (metHb), cuya degradación de productos tiene como consecuencia la síntesis de radicales superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) (Kuhn *et al.*, 2017; Cortese-Krott y Shiva, 2019).

Con el propósito de hacer frente al daño oxidativo y mantener el equilibrio osmótico, los eritrocitos efectúan reacciones de defensa enzimáticas catalizadas por la superóxido dismutasa

(SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT), hemo oxigenasa-1 (HO^{-1}) y el sistema tiorredoxina, así como no enzimáticas, en las que intervienen el monodialdehído (MDA), glutatión (GSH) y glutatión disulfuro (GSSG) (He *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Duvigneau *et al.*, 2019). La saturación y la ineficiencia de los mecanismos antioxidantes de los eritrocitos promueve la pérdida de la integridad de la membrana plasmática (Fibach y Dana, 2019). Estos fenómenos eventualmente contribuyen al daño arquitectónico de los eritrocitos (Rapido, 2017), lo que conduce a la hemólisis (Fibach, 2021) que comprende la ruptura de la membrana celular de las células sanguíneas, liberando hemoglobina y otros componentes intracelulares al plasma circundante. Su detonante es la peroxidación lipídica, reacción desencadenada principalmente por radicales peroxilo, particularmente focalizada en los fosfolípidos de la membrana celular (Barodka *et al.*, 2014; Nuruki *et al.*, 2021).

En los seres humanos el estrés oxidativo moderado, desencadenado por una enfermedad o deficiencias enzimáticas leves, puede promover efectos hemolíticos limitados, razón por la que los radicales pueden ser amortiguados por los sistemas antioxidantes de los glóbulos rojos sanos. Sin embargo, al tratarse de una hemólisis significativa y persistente, la cantidad de hemoglobina plasmática es capaz de saturar la protección proporcionada por la haptoglobina y hemopexina, lo que tiene como consecuencia daño vascular y orgánico grave, así como enfermedades hemolíticas, asociadas con el estrés oxidativo (Cadamuro *et al.*, 2017; Yalamanoglu *et al.*, 2018).

I.4.3.2. Enfermedades asociadas a la hemólisis

Entre las afecciones hemolíticas suscitadas por la hemólisis intravascular se encuentran la hemoglobinuria paroxística nocturna, la enfermedad de células falciformes, talasemias, esferocitosis y estomatocitosis hereditarias, anemias hemolíticas microangiopáticas, deficiencia de piruvato quinasa, anemia hemolítica autoinmune idiopática grave, anemia inducida por infecciones, malaria, anemia inducida por válvulas cardíacas mecánicas y anemias inducidas por sustancias químicas (Chisté *et al.*, 2014). La hemólisis también está asociada al Alzheimer, la insuficiencia renal y el envejecimiento celular (Riss *et al.*, 2007).

Una alternativa para la prevención y el tratamiento de enfermedades hemolíticas son los compuestos bioactivos (Martín-Ortega y Segura-Campos, 2018). La ponderación de la actividad antihemolítica de los compuestos bioactivos mediante distintos bioensayos debe proceder de una evaluación de la acción citotóxica, cuyos resultados precisan su biocompatibilidad sanguínea (Belokoneva *et al.*, 2003; Jadhav *et al.*, 2018).

La biocompatibilidad es la capacidad propia de un biomaterial para no generar efectos indeseados bajo condiciones fisiológicas. Los compuestos bioactivos eficientes no deben promover daño en los tejidos blanco y adyacentes. Los ensayos de biocompatibilidad frecuentemente determinan la aparición de trombosis, respuestas inmunes adversas como reacciones alérgicas y hemólisis (Patel, 2021). La hemólisis está establecida como una de las principales evaluaciones de toxicidad inicial. Los eritrocitos humanos son las células más frecuentemente utilizadas en ensayos *in vitro* de la actividad antihemolítica (Palacios-Ortega *et al.*, 2021).

I.4.3.3. Actividad antihemolítica

Los eritrocitos humanos presentan cualidades que los distinguen como un excelente modelo biológico de membrana lipídica, entre ellas se encuentran su aislamiento relativamente sencillo, la alta concentración de PUFA de membrana, la alta tensión del oxígeno y de las moléculas de hemoglobina activa, por ende, permiten identificar especialmente los efectos del estrés oxidativo (Farg y Alagawany, 2018). La peroxidación lipídica de las membranas plasmáticas es el primer indicio de daño celular oxidativo (Nuruki *et al.*, 2021) y consiste en una reacción en cadena que promueve la oxidación de PUFA y otros sustratos bajo condiciones aeróbicas (Naparło *et al.*, 2020).

El AAPH es un iniciador de radicales libres capaz de realizar reacciones similares a las de los sistemas biológicos, razón por la que es empleado recurrentemente en bioensayos con la finalidad de ponderar la inhibición de la hemólisis en eritrocitos. La descomposición térmica del AAPH genera dos moléculas alquilo, las cuales pueden reaccionar con el oxígeno molecular para producir radicales peroxilo y alcoxilo, los cuales presentan actividad prooxidante (Nuruki *et al.*, 2021). El AAPH tiene una vida media de 175 h bajo pH neutro y una temperatura de 37

°C, con una tasa de generación de radicales libres de 1.3×10^{-6} AAPH/s (Niki, 1990). Los ensayos hemolíticos *in vitro* auxiliados con espectrofotometría y basados en las reacciones con AAPH, son una prueba eficaz y simple para la medición cuantitativa de la hemólisis, además, su aplicación perpetúa el uso de animales de experimentación, ya que fungen como un requisito previo a los análisis *in vivo* (Farang y Alagawany, 2018).

La capacidad antihemolítica de compuestos bioactivos de origen microalgal ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones, algunos de ellas están enfocadas en la evaluación de la C-FC, una proteína fotosintética propia de las cianobacterias, con importancia práctica y biológica que se destacará en el siguiente capítulo (Eriksen, 2008; Manirafasha *et al.*, 2016).

Se realizó un estudio para la determinación del efecto antihemolítico de la C-FC sobre eritrocitos humanos, donde fue capaz de proteger a las células contra los radicales peroxilo inducidos por AAPH, bajo concentraciones de 0.012, 0.025, 0.050 y 0.075 mM, donde los porcentajes de inhibición de hemólisis (% IH) fueron de 12.0, 24.5, 87.5 y 97.7%, respectivamente, aunado a su capacidad secuestradora de radicales en una fase acuosa a través de un mecanismo similar al del ácido ascórbico y trolox (Romay y González, 2000).

En el estudio de Pleonsil *et al.* (2013) se demostró que la apo-C-FC(β) recombinante y C-FC nativa presentan capacidad protectora ante el daño oxidativo frente a los radicales inducidos por H_2O_2 y AAPH. La capacidad inhibitoria frente a la hemólisis inducida por AAPH bajo concentraciones de 0.01, 0.10 y 1.00 μ M fue de 35, 55 y 77 %IH y de 75, 83 y 95 %IH, efectuada por la apo-C-FC(β) y C-FC nativa, respectivamente. Además, la C-FC nativa y apo-C-FC(β) redujeron el grado y porcentaje de eritrocitos morfológicamente anormales (22% y 37%, respectivamente), cuyas alteraciones fueron inducidas por H_2O_2 . Adicionalmente, Pleonsil y Suwanwong (2013) determinaron que la C-FC presenta un efecto protector contra el H_2O_2 sobre proteínas de membrana de eritrocitos (espectrina, anicrina y actina), previniendo su degradación. Las alteraciones en la proteína de las membranas de los eritrocitos inducidas por H_2O_2 y la capacidad de C-FC en la protección de la membrana fueron determinadas mediante la realización de un gel electroforético SDS-PAGE, donde la exposición de los eritrocitos a altas concentraciones de H_2O_2 condujo a la degradación de todas las principales proteínas de membrana de eritrocitos, indicando que la C-FC presenta capacidad protectora de las proteínas

de membrana en eritrocitos ante la degradación inducida por el daño oxidativo, previniendo la hemólisis.

Si bien la C-FC ha demostrado su potencial para desarrollar actividad antihemolítica en eritrocitos humanos, por principio de adición, este podría presentarse también en el resto de las FBP, lo que representa un aspecto interesante a estudiar.

I.5. Ficobiliproteínas

I.5.1. Generalidades

Las FBP en conjunto con los fitocromos integran un grupo de compuestos conocido como "biliproteínas". La estructura de las biliproteínas consiste en un cromatóforo denominado "bilina" y una apoproteína unidos por enlaces tioéter (MacColl, 1998; Scheer y Zhao, 2008; Manirafasha *et al.*, 2016). El término bilina surge por la alusión a su similitud estructural con los pigmentos biliares bilirrubina y biliverdina, además, este puede ser sustituido por el concepto "ficobilina", el cual fue acuñado por Rudolf Lemberg en la década de 1920 haciendo referencia a su procedencia en algas (Sonani *et al.*, 2015).

Los fitocromos son un tipo de biliproteína (Grossman *et al.*, 1993; Manirafasha *et al.*, 2016) distinguidos por su absorción de energía en el campo rojo y rojo-lejano. Son sintetizados por algunas bacterias, hongos y plantas (O'Carra *et al.*, 1980). Estructuralmente la bilina se encuentra anclada al dominio proteico PAS o GAF, los cuales a su vez están enlazados al carbono terminal del núcleo fotosintético (Chang *et al.*, 2015; Kannaujiya *et al.* 2017). Presentan un solo cromatóforo en uno de los dos sitios alternativos de anclaje, mientras que las FBP cuentan con 1 a 4 cromatóforos (Eriksen, 2008) (Figura 2).

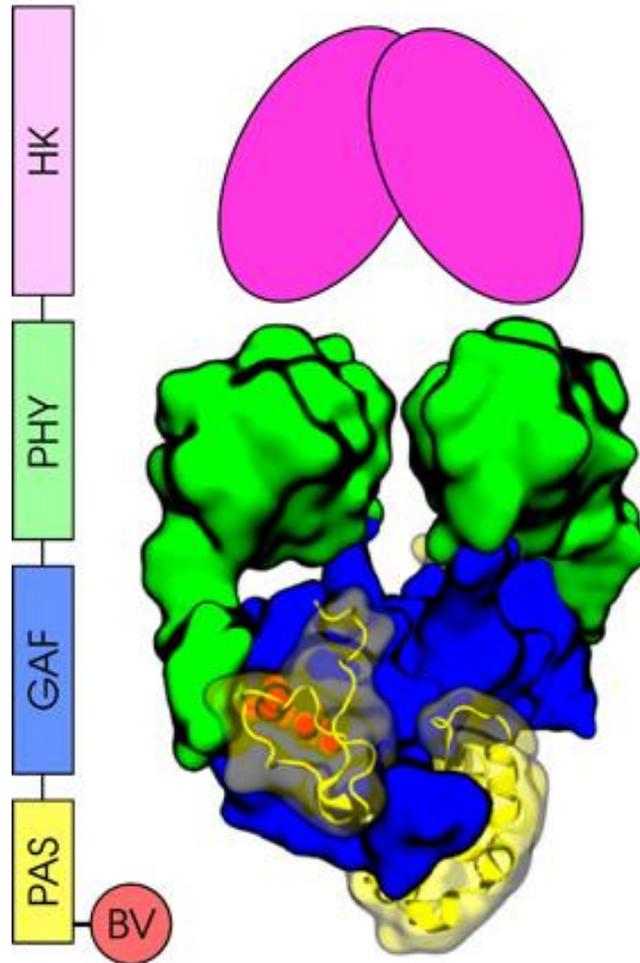


Figura 2. Representación estructural de un fitocromo bacteriano.

Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Phytochrome-structure-y-photoconversion-A-Sequential-y-structural-representation_fig1_306089708

Las FBP son un grupo extenso de pigmentos antena propios de las cianobacterias, criptofitas, glaucofitas y rodofitas. Se caracterizan por ser hidrosolubles y fluorescentes. Están organizadas en ficobilisomas, un complejo multiproteico capaz de capturar energía en un rango de longitud de onda de los 450 a 650 nm, esta es transferida de manera unidireccional y es liberada en las moléculas de clorofila presentes en el fotosistema, cuya capacidad de absorción es pobre en ese rango, coadyuvando considerablemente a la fotosíntesis global (Björling *et al.*, 2016; Dagnino-Leone *et al.*, 2022).

I.5.2. Estructura

Las FBP están conformadas por ficobilinas unidas covalentemente al residuo de cisteína de la apoproteína, por medio de uno o dos enlaces tioéter (Scheer y Zhao, 2008; Anwer *et al.*, 2015; Sonani *et al.*, 2015). *Sensu stricto*, las FBP están conformadas por dos ficobilinas unidas covalentemente a los residuos de cisteína en la posición 84 de las subunidades α y β , si presenta otras ficobilinas, estas pueden estar enlazadas a algunos sitios adicionales de cisteína, como α_{75} , α_{140} , $\beta_{50/61}$, β_{155} , etc. (Anwer *et al.*, 2015).

Las ficobilinas consisten en cadenas lineares tetrapirrólicas y representan el grupo prostético de complejo proteico, además, son determinantes en las características espectroscópicas de las FBP (Bermejo-Román *et al.*, 2001; Pignolet *et al.*, 2013). Están presentes en diferentes formas isoméricas: ficocianobilina (FCB, $\lambda_{\max} = 640$ nm, azul), ficoviolobilina (FVB, $\lambda_{\max} = 590$ nm, violeta), ficoeritrobilina (FEB, $\lambda_{\max} = 550$ nm, roja) y ficourobilina (FUB, $\lambda_{\max} = 490$ nm, amarilla) (Arteni *et al.*, 2008; Liu, 2016; Dagnino-Leone *et al.*, 2022). El color particular de las ficobilinas, y sus características espectroscópicas en general, son consecuencia de su estructura, principalmente del sistema de dobles enlaces conjugados, por ejemplo, la FEB contiene seis dobles enlaces conjugados que absorben a longitudes de onda menores que la FCB, la cual tiene ocho dobles enlaces conjugados (Kaňa *et al.*, 2014; Dagnino-Leone *et al.*, 2022). La estructura primaria de las ficobilinas se plasma en la Figura 3.

La apoproteína tiene una elongación de 160-165 aminoácidos y está compuesta por las subunidades α y β , cuyos pesos moleculares son de 12-20 y de 15-20 kDa, respectivamente. Las subunidades son mutuamente homólogas, y consisten en globinas enlazados a cromatóforos y un nitrógeno terminal regularmente oligomerizado (Anwer *et al.*, 2015). Las dos subunidades, los monómeros α y β , tienden a formar heterodímeros ($\alpha\beta$), los cuales pueden estar oligomerizados como dímeros ($\alpha\beta$)₂ (sólo en Criptofitas) y trímeros ($\alpha\beta$)₃. Los trímeros se pueden apilar para formar hexámeros ($\alpha\beta$)₆, con o sin proteínas enlazadoras en su cavidad central (Bermejo-Román *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2015). En el caso de la FE, existe una tercera subunidad asociada a los agregados, la γ (Glazer, 1988). El estado de agregación de la ficobiliproteína depende del organismo y de las condiciones de extracción, tales como la concentración proteica, la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el solvente utilizado (Scheer y Zhao, 2008).

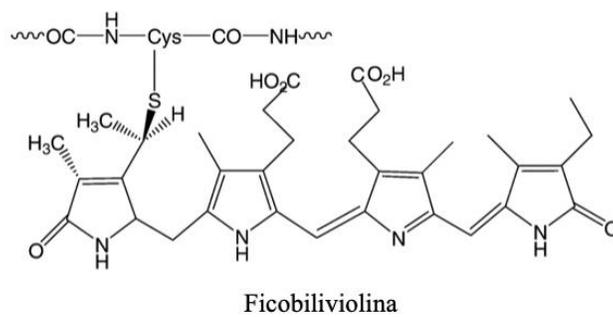
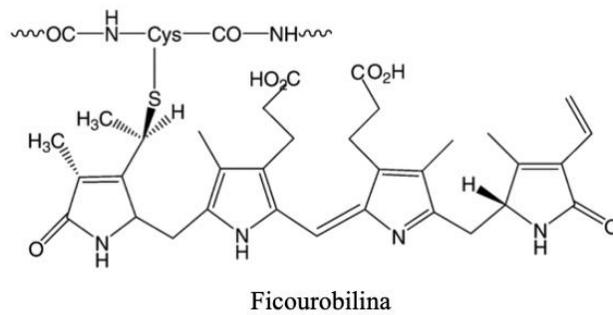
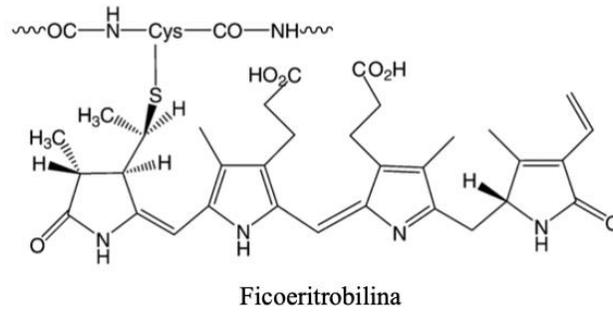
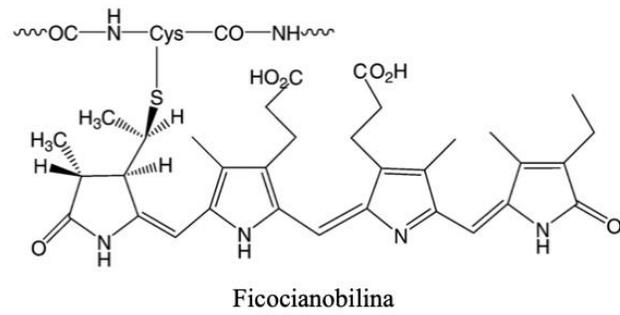


Figura 3. Principales tipos de ficobilinas.

Obtenida de:

https://www.researchgate.net/profile/James_Lyers/publication/8019466/figure/fig4/AS:668832712646656@1536473553018/Common-phycobilins-shown-bound-to-peptides-via-thioether-linkages-to-cysteiny-residues.png

I.5.3. Características fisicoquímicas

Los ficobilisomas son el principal complejo accesorio cosechador de luz de *P. cruentum* (Apt *et al.*, 1995; MacColl, 1998). Pertenecen al morfotipo hemielipsoidales con un peso molecular de 5 a 10 MDa y sus dimensiones son de $64 \times 42 \times 28$ nm (largo \times ancho \times alto) (Kuddus *et al.*, 2013).

Están conformados por proteínas enlazadoras, denominadas en algunos estudios como proteínas o FBP de anclaje, estas son polipéptidos incoloros de naturaleza hidrofóbica que participan en el ensamblaje de los ficobilisomas a diferentes niveles (Ducret *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 2015; Liu, 2016). Su estructura consiste en un núcleo de tres trímeros de AFC adyacentes a la membrana tilacoidal y una varilla de proteínas periféricas, las cuales pueden ser únicamente FC o una combinación de FC, FE y FEC, característica especie-dependiente (Onishi *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Se encuentran organizadas de mayor a menor absorbancia, como seis cilindros de seis hexámeros de FE en la periferia, seis cilindros de dos hexámeros de FC en el centro y tres anillos de tres trímeros de AFC adyacentes al fotosistema II (FSII) en la membrana tilacoidal del cloroplasto. Las interacciones entre las bilinas, la apoproteína y las proteínas enlazadoras, así como sus grados de conjugación, le confieren al ficobilisoma una amplia diversidad espectral, raíz de la eficiencia de su capacidad de absorción, transferencia y canalización de energía hacia la clorofila, desde el centro de reacción a través de la membrana (Montgomery, 2017).

Las FBP se clasifican según sus propiedades espectroscópicas, las cuales dependen de la clase y cantidad de ficobilinas en su estructura, así como del ambiente proteico que las rodea y sus interrelaciones estéricas (Bermejo-Román *et al.*, 2001; Pignolet *et al.*, 2013). Se clasifican como: ficoeritrina (FE), ficoeritrocianina (FEC), ficocianina (FC) y aloficocianina (AFC) (Manirafasha *et al.*, 2016). Las FE se subdividen en R-FE y B-FE, mientras que las FC en R-FC y C-FC, haciendo alusión al primer taxón del que fueron aisladas (R- corresponde a Rodophyta, B- al orden Bangiales y C- a Cyanobacteria) (Eriksen, 2008). Algunas de las principales características fisicoquímicas de las FBP se pueden desglosar en la Tabla 3.

Tabla 3. Características fisicoquímicas de las FBP.

Característica	FE		FC		AFC	FEC	Fuente
	R-FE	B-FE	C-FC	R-FC			
Color	Rojo	Rojo	Azul	Azul	Verde azul	Naranja	Bryant y Canniffe <i>et al.</i> , 2012
Peso molecular (kDa)	240	240	70-110	135	105	100	Chiong <i>et al.</i> , 2016; Alamgir, 2018; Huang <i>et al.</i> , 2021
Absorbancia máxima (nm)	565	545	615	617	652	575	Li <i>et al.</i> , 2019; Larkum, 2020
Pico de fluorescencia (nm)	575	575	647	637	660	625	Li <i>et al.</i> , 2019; Larkum, 2020
Estado de agregación y ficobilinas	12 α FEB, 12 β FE, B, 6 β FU, B, 2 γ FU, B, 1 γ FEB	12 α FEB, 18 β FEB, 2 γ FUB, 2 γ FEB	3 α FC, B, 6 β F, CB	3 α FC, B, 3 β F, EB, 3 β FCB	3 α FC, B, 6 β F, CB	3 α FXB, 6 β FCB	Li <i>et al.</i> , 2019; Larkum, 2020

I.5.4. Función de las ficobiliproteínas en microalgas

En el ambiente marino la irradiancia y distribución espectral de la luz es heterogénea debido a una serie de características físicas como la reflexión, absorción y dispersión de la luz (Kirk, 2011; Dagnino-Leone *et al.*, 2022) (Figura 4). Existe una absorción preferencial de los fotones de longitudes de onda larga con baja energía, como la luz roja, la cual es la principal determinante de la distribución espectral de la atenuación de la luz, sin embargo, longitudes de onda corta con alta energía penetran a mayor profundidad. Como resultado, las regiones azul-verde del espectro visible predominan en las zonas más profundas del océano, las cuales no son conformantes de la PAR (Manirafasha *et al.*, 2016). Este fenómeno obstaculiza la fotosíntesis debido al limitado rango de captación y absorción de energía lumínica de la clorofila. Para solventar ese problema, los organismos, como las cianobacterias y algas rojas, han desarrollado complejos auxiliares fotosintéticos que les permiten colonizar ambientes donde el uso de energía solar por parte de la clorofila es ineficaz. De hecho, algunas cianobacterias y algas rojas pueden sobrevivir en ambientes de irradiancia superficial menor al 1%, inclusive, los requerimientos de irradiancia de algunas especies pueden estar por debajo del 0.1% (Manirafasha *et al.*, 2016; Dagnino-Leone *et al.*, 2022). Los complejos auxiliares fotosintéticos posibilitan la captura de energía lumínica en zonas donde predomina la luz verde y amarilla (500 a 600 nm), posteriormente se envía hacia clorofila para dar pie a la fotosíntesis, reacción indispensable para la colonización y población de ambientes acuáticos austeros. Entre estos sistemas colectores de luz se encuentran los ficobilisomas (Dagnino-Leone *et al.*, 2022).

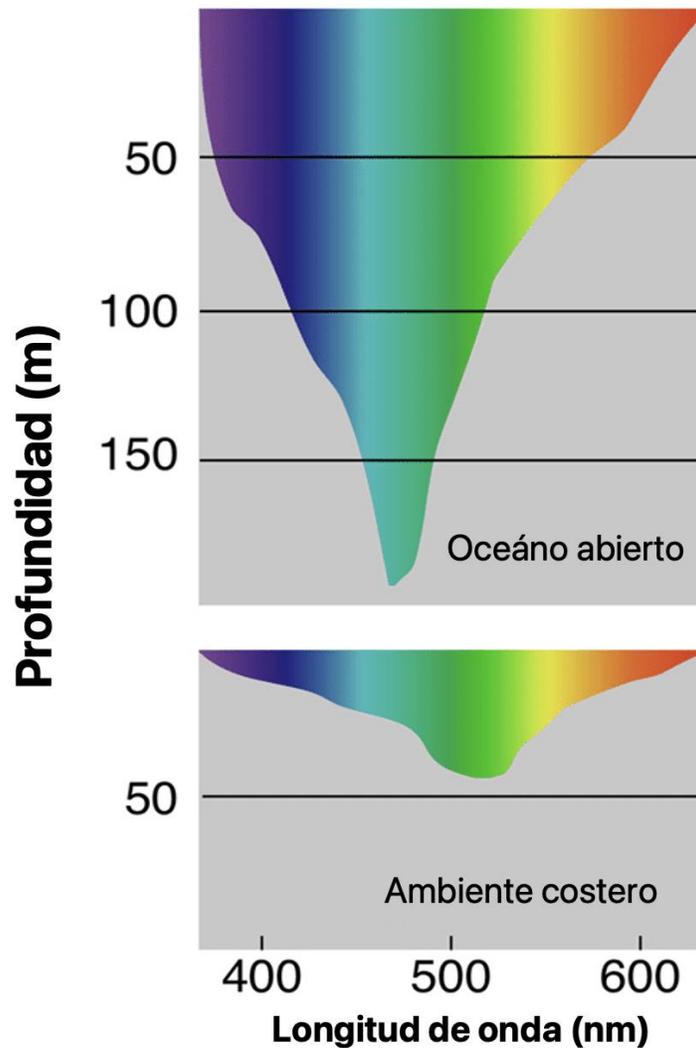


Figura 4. Atenuación de la luz en diferentes ambientes marinos (modificada).

Obtenida de:

https://www.researchgate.net/profile/Jarone_Pinhasi/publication/308125417/figure/fig2/AS:407017211613186@1474051873984/Absorption-spectra-of-PRs-in-relation-to-light-attenuation-patterns-in-different-marine.png.

Aparentemente los ficobilisomas presentan una movilidad relativamente alta, interpretada como una redistribución de la energía en los fotosistemas por un proceso de transiciones de estado. Esto se ha reportado en las microalgas mesófilas *P. cruentum* y *Rhodella violacea* al aplicar el método de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueado. Se registraron cambios de fluorescencia al excitar a los ficobilisomas con un haz de láser, y su emisión se

midió por arriba de los 665 nm, indicando movilidad. Se plantea que esta cualidad tiene una función regulatoria importante (Bermejo-Román *et al.*, 2001), sin embargo, es un fenómeno que no ha sido completamente dilucidado.

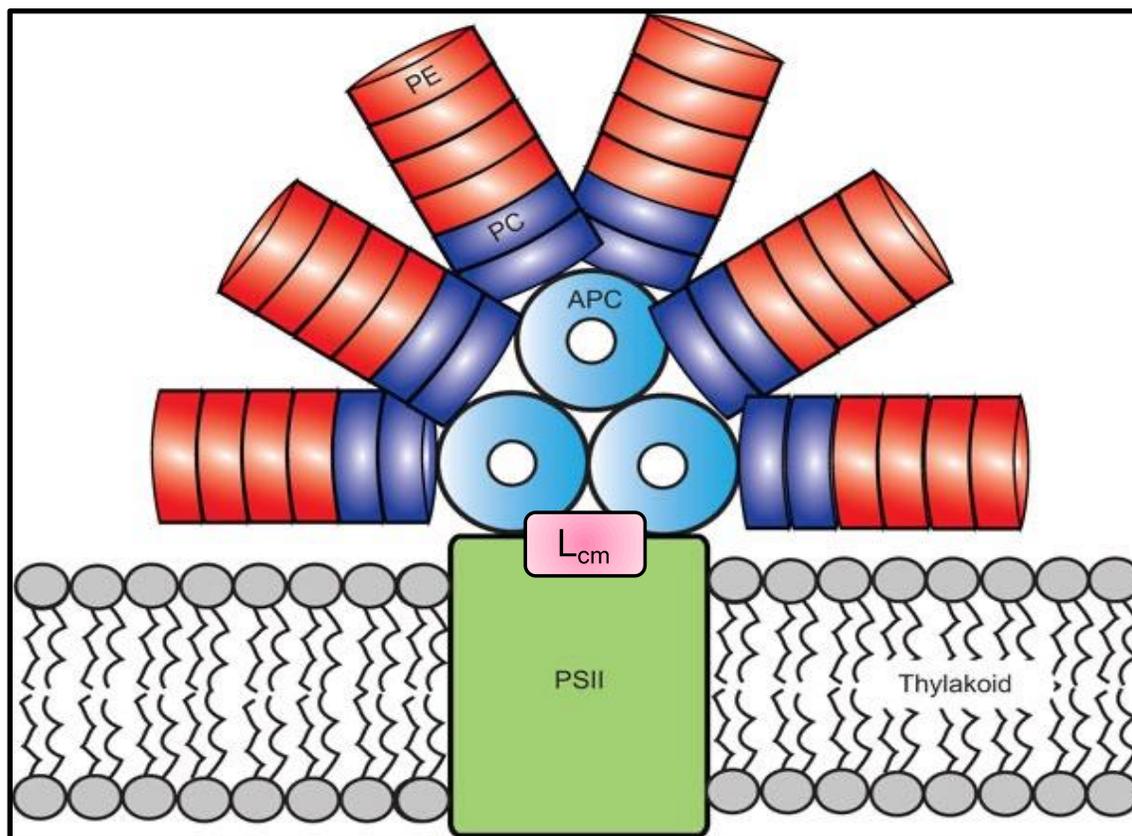


Figura 5. Representación esquemática del ficobilisoma en la membrana tilacoidal, cercano al fotosistema II (FSII) (modificada).

Fuente: <https://www.eurekaselect.com/145534/article>

I.5.5. Aplicaciones de las ficobiliproteínas

Las FBP tienen usos potenciales en la industria cosmética y alimentaria como colorante, en el diagnóstico médico como marcadores fluorescentes de inmunoensayos, citometría de flujo e histoquímica (Glazer, 1994). *P. cruentum* es fuente de AFC, FC y FE. La B-FE es el pigmento cosechador de luz de mayor abundancia y valor económico de *P. cruentum* debido a su alta

eficiencia de fluorescencia y potencial terapéutico (actividad inmunomoduladora y anticarcinogénica) (Ou *et al.*, 2012; Mysliwa-Kurdziel y Solymosi, 2017).

Los enlaces covalentes apoproteína-cromóforo son un aspecto importante para sus aplicaciones, ya que la unión covalente a través de los enlaces tioéter entre la apoproteína y la bilina mantiene la labilidad de los cromóforos y proteínas (Li *et al.*, 2019). Los ficobilisomas se desintegran al ser extraídos con búfer acuoso, por lo que las ficobilinas pierden sus aceptores liberando energía luminosa mediante una intensa emisión fluorescente. Este hecho, y el estado de agregación hexamérico de muchas ficobilinas, les adjudica excelentes propiedades fluorescentes (Eriksen, 2008).

I.5.6. Actividades biológicas de las ficobiliproteínas

Además de sus aplicaciones prácticas, se han reportado diversas actividades biológicas: antioxidante, antiviral, antitumoral, inmunoestimulante y antiinflamatoria (Romay y Gonzalez, 2000; Eriksen, 2008; Kuddus *et al.*, 2013; Manirafasha *et al.*, 2016). Dentro de la actividad antioxidante de las ficobilinas y FBP se encuentra la capacidad de inhibición de radicales libres (actividad antirradicalaria), ya que pueden secuestrar especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN). Además, poseen la cualidad de retrasar o inhibir la oxidación de lípidos (peroxidación lipídica) y proteínas (proteólisis) en la membrana plasmática (Manirafasha *et al.*, 2016). También están asociadas con el incremento de la cantidad de enzimas antioxidantes. La FC es un agente quelante de iones férricos (Bermejo-Román *et al.*, 2001), los cuales están involucrados en muchos procesos de generación de radicales libres. Los efectos hepatoprotectores, antiinflamatorios y anticancerígenos están ligados a su fuerte capacidad antioxidante (Ou *et al.*, 2012; Mysliwa-Kurdziel y Solymosi, 2017).

Las FBP podrían causar reacciones alérgicas, por lo que se sugiere administrarlas de forma oral. Al ingresar al sistema digestivo se hidrolizan como aminoácidos, péptidos y ficobilinas. Aún no está completamente dilucidado cómo las FBP o sus metabolitos intervienen en las vías metabólicas (Li *et al.*, 2019).

II. HIPÓTESIS

Las ficobiliproteínas extraídas de *Porphyridium cruentum* generarán una actividad antihemolítica mediante la inhibición de la peroxidación inducida por radicales libres en membranas de eritrocitos.

III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

Evaluar el potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum*.

III.2. Objetivos particulares

- Caracterizar fisicoquímicamente las ficobiliproteínas de los extractos acuosos de *P. cruentum*.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos procedentes de *P. cruentum*.
- Determinar la biocompatibilidad sanguínea de los extractos obtenidos de *P. cruentum*.
- Evaluar el potencial eritroprotector de los extractos de *P. cruentum*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Obtención de la microalga roja *Porphyridium cruentum*

La microalga roja *Porphyridium cruentum* fue obtenida de la colección de cepas del Laboratorio de Análisis Químico y Microbiología de la Academia de Acuicultura, con sede en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS).

IV.2. Diseño experimental

Se realizó un diseño unifactorial completamente al azar con un mínimo de tres repeticiones para cada análisis ($n \geq 3$).

IV.3. Cultivo y obtención de la biomasa de *Porphyridium cruentum*

El cultivo de la microalga *P. cruentum* tuvo lugar en el Laboratorio de Análisis Químico y Microbiología del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora (DICTUS). Este se efectuó en una mezcla de agua de mar filtrada y agua destilada, con una salinidad final de 35 unidades prácticas de salinidad (UPS) enriquecida con medio F/2 de Guillard y Ryther (1962) (Tabla 4). Los cultivos microalgales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$). La iluminación fue suministrada por lámparas tubulares fluorescentes, con una calidad (luz blanca; $\lambda = 400\text{-}750\text{ nm}$) e intensidad lumínica ($35\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) constantes, bajo un fotoperiodo continuo.

A partir de la cepa madre se inoculó por cuadruplicado el medio de cultivo previamente esterilizado en tubos de 10 mL, consecutivamente, se realizó un escalamiento en matraces de 250 mL (volumen operacional 150 mL), 1 L (volumen operacional 750 mL) y 2 L (volumen operacional 1.5 L), para finalizar en tinas de 14 L (volumen operacional 10 L), con una concentración celular de $130,000\text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$. La representación del escalamiento se muestra en la Figura 6.

Se cosechó la biomasa en el décimo día de de cultivo, el cual, representó el inicio de la fase estacionaria. Ulteriormente, se centrifugó la biomasa a 5000 rpm por 15 minutos en el equipo Thermo Scientific™, Heraeus™ modelo Multifuge™ X1R con el propósito de recuperarla por sedimentación. Se congeló la biomasa en ultracongelador a -80 °C (New Brunswick, Modelo U9270-0002). Finalmente, se liofilizó la biomasa (Yamato Scientific Co. LTD lyophilizer, Modelo DC401) y se preservó en congelación.

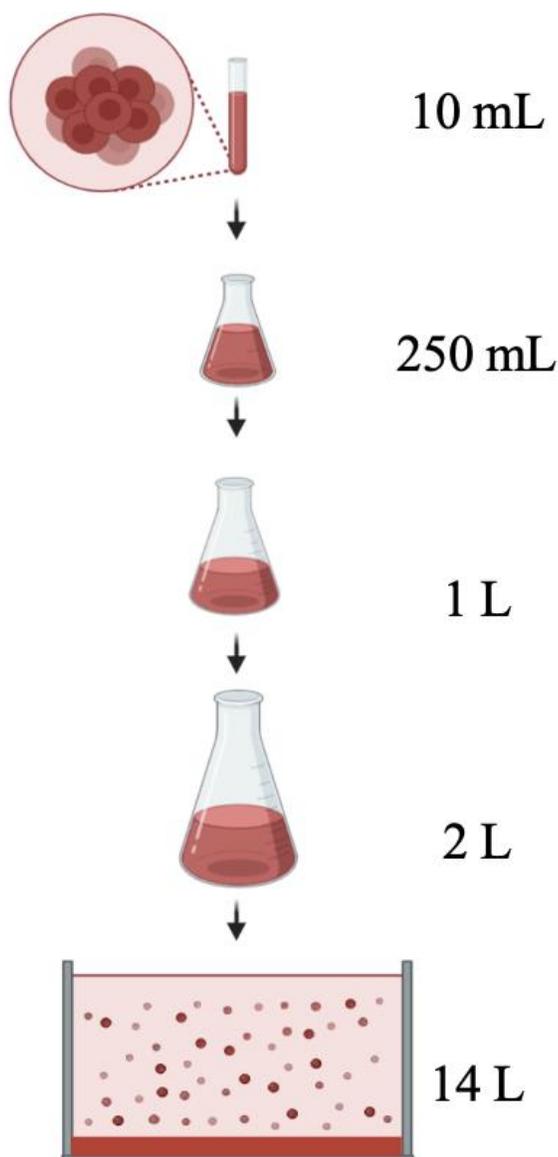


Figura 6. Escalamiento de *Porphyridium cruentum*.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962).

Solución de nutrientes	de	Nombre	Fórmula	mg/L de agua destilada
Nitratos y fosfatos		Nitrato de sodio	NaNO ₃	75,000
		Fosfato de sodio monobásico	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,000
		Sulfato cúprico	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9.8
Metales		Sulfato de zinc	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22
		Cloruro de cobalto	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10
		Cloruro manganoso	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180
		Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6.3
		Cloruro férrico	FeCl ₃ ·6H ₂ O	315
		EDTA disódico	Na ₂ EDTA	436
		Biotina cristalizada	C ₁₀ H ₈₈ CON ₁₄ P	0.1
Vitaminas		Cianocobalamina	C ₆₃ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1
		Tiamina	C ₁₂ H ₁₇ CIN ₄ OS	2

IV.4. Concentración celular y cinética de crecimiento

Se realizaron al menos dos conteos diarios en cuadruplicados de matraces de 250 mL, durante 13 días, con el fin de estimar la concentración celular y la cinética de crecimiento de *P. cruentum*. Para ello, se tomaron muestras diarias del cultivo microalgal de los matraces, las cuales se fijaron con una solución de lugol (I₂ 1% y KI 2% en agua destilada). Se removió el exceso de la biomasa microalgal de las paredes y de la base del matraz con una varilla estéril con el fin de homogenizar el cultivo.

Los conteos tuvieron lugar en una cámara de Neubauer de 0.1 mm, bajo un microscopio óptico compuesto Carl Zeiss modelo Axiostar plus 1169-149; específicamente se utilizaron los cuadrantes 1, 5, 13, 21 y 25 de la microcámara de conteo, ilustrada en la Figura 6. Los datos del número de células por cuadrante se ingresaron en una base de datos de Excel, misma en la que se obtuvo la concentración celular, con base en la ecuación de Arredondo-Vega y Voltolina (2007) (Ec. 1), así como sus desviaciones estándar, datos con los que se estableció la cinética de crecimiento de *P. cruentum*. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

$$\text{Ec. 1: } C = n / (4 \cdot 10^{-6})$$

Donde C es la concentración celular (número de células·mL⁻¹), n el promedio de las células presentes en los 5 cuadrantes de la microcámara central (número de células) y el factor de conversión, que corresponde al volumen de la muestra expresado en cm³ (mL) sobre el área de los cuadrantes, la cual equivale a 0.004 mm³ o 0.004 μL, producto de los factores: 0.2 mm · 0.2 mm · 0.1 mm.

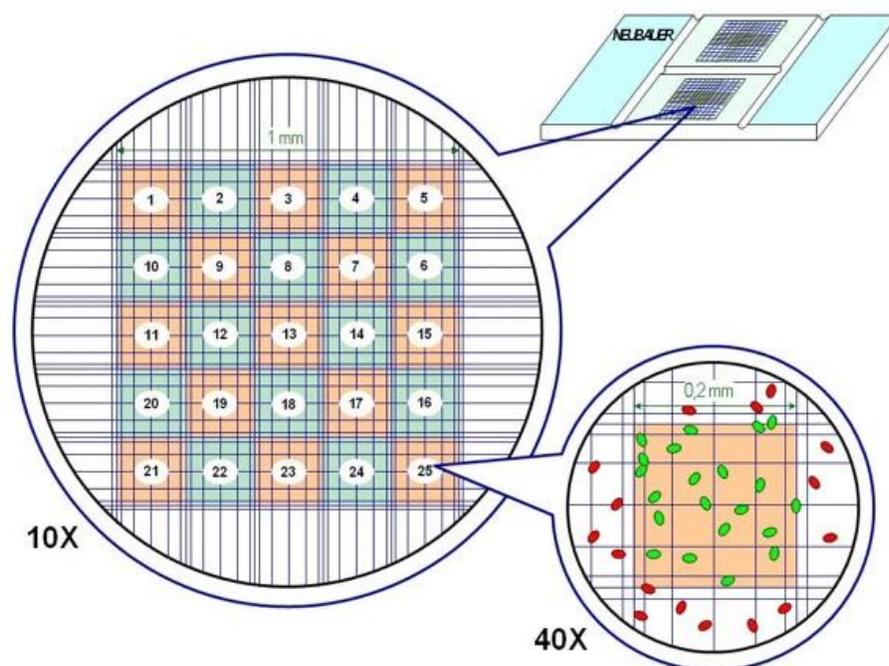


Figura 7. Conteos de *Porphyridium cruentum* en la microcámara de conteo de la cámara de Neubauer. Obtenida de: http://insilico.ehu.es/camara_contaje/neubauer_improved.php.

IV.5. Extracción de ficobiliproteínas

Se pesaron 0.5 g de la biomasa liofilizada y se aforó a 25 mL con metanol al 99% para remover clorofilas y carotenoides. Para la inducción de la ruptura de la membrana externa de polisacáridos de la microalga, se realizó una extracción asistida con ultrasonido (Generator ultrasonic pulses Branson Digital Sonifier Osonica, LLC. E.U.A.) aplicando 3 pulsos de 15 segundos en intervalos de 1 minuto (amplitud de 30%, 400 W y 500 mHz). Se dejó reposar en oscuridad durante 24 h a 4 °C y se repitió la extracción metanólica. Se realizó el mismo

procedimiento con Tris HCl 0.5 M y solución fisiológica con el fin de obtener extractos acuosos ricos en FBP. Se dejó en agitación toda la noche y se centrifugó a 2000 rpm a 4 °C (Tran *et al.*, 2019; González-Vega *et al.*, 2021). Se obtuvieron dos extractos acuosos (solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M) y uno metanólico (metanol al 99%).

IV.6. Cuantificación de pigmentos

Se cuantificaron parcialmente los pigmentos por espectrofotometría utilizando las ecuaciones propuestas a partir de coeficiente de extinción molar en un espectrofotómetro de microplacas de 96 pocillos (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Se estimó la concentración de las diferentes ficobiliproteínas (AFC, B-FE y R-FC) en los extractos acuosos siguiendo los protocolos de Bennett y Bogorad (1973), Bryant *et al.* (1979) y Beer y Eshel (1985) (Ec. 2 - Ec. 4). Adicionalmente, se estimó la concentración de clorofilas totales (C_{total}) y carotenoides totales (C_{x+c}) del extracto metanólico siguiendo la metodología publicada por Lichtendthaler y Wellburn (1983) y Wellburn (1994) (Ec. 5-Ec. 6). Se estandarizó la técnica utilizando como blancos metanol, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M. Para las determinaciones se colocaron 300 μ L de extracto en una microplaca de 96 pocillos.

$$\text{Ec. 2: AFC} = (A_{560} - 0.19 \cdot A_{620}) / 5.65$$

$$\text{Ec. 3: B-FE} = [A_{565} - 2.8 \cdot (\text{R-FC}) - 1.34 \cdot (\text{AFC})] / 12.7$$

$$\text{Ec. 4: R-FC} = (A_{620} - 0.7 \cdot A_{565}) / 7.38$$

$$\text{Ec. 5: } C_{total} = (21.3877 \cdot A_{630}) + (10.3739 \cdot A_{647}) + (10.3739 \cdot A_{664}) + (5.5309 \cdot A_{691})$$

$$\text{Ec. 6: } C_{x+c} = [(1000.65 \cdot A_{470}) - (2.86 \cdot C_a) - (129.2 \cdot C_b)] / 221$$

IV.7. Determinación cuantitativa de proteínas

La concentración de proteínas se estimó cuantitativamente por el método de ácido bicinónico (BCA) (Smith *et al.*, 1985).

IV.8. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas

Se realizaron diferentes bioensayos para el análisis de actividades biológicas a los extractos acuosos ricos en FBP de solución fisiológica, Tris HCl 0.5 M y al extracto metanólico, incluyendo la determinación de la actividad antioxidante (ABTS⁺, DPPH[•] y FRAP), el ensayo de biocompatibilidad sanguínea y el potencial eritroprotector (ensayo de inhibición de hemólisis por AAPH, hipotonicidad y calor). Todos los bioensayos se realizaron con un mínimo de tres repeticiones (n≥3).

IV.8.1. Determinación de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de los extractos (solución fisiológica, Tris HCl 0.5 M y metanol al 99%) mediante la evaluación del potencial antirradicalario (ensayo de inhibición de ABTS⁺ y DPPH[•]) y del potencial reductor (FRAP). Se realizó una curva Trolox para expresar los resultados de los distintos ensayos de actividad antioxidante como $\mu\text{mol ET}$ (equivalentes Trolox)/g PS. El Trolox consiste en un antioxidante estándar sintético hidrofílico análogo a la vitamina E. La unidad de equivalentes Trolox implica la capacidad antirradicalaria y reductora del antioxidante Trolox. Además, se analizó la capacidad de inhibición de los radicales peroxilo y alcoxilo generados por AAPH sobre eritrocitos humanos.

IV.8.1.1. Ensayo de inhibición del radical libre ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS⁺).

Se analizó la actividad antirradicalaria frente al radical libre ABTS⁺ con base en la técnica descrita por Re *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Se disolvió sal ABTS (19.3 mg) en agua destilada (5 mL), posteriormente, se añadieron 88 μL solución de persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (88 μL) (0.0378 g/L) y se dejó reposar en oscuridad durante 12 h con el fin de oxidar el ABTS a ABTS⁺. Se diluyó la solución ABTS⁺ con etanol al 99% hasta obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.05 a 734 nm. En una microplaca de 96 pocillos se efectuaron por triplicado los siguientes tratamientos: control negativo (20 μL de etanol + 270 μL de ABTS⁺), control estándar (20 μL de antioxidante estándar + 270 μL de ABTS⁺) y muestras (20 μL de extracto + 270 μL de ABTS⁺). Se dejó reposar durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente,

ulteriormente, se tomaron las lecturas a 734 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron como $\mu\text{mol ET (equivalentes Trolox)}/\text{g PS}$.

IV.8.1.2. Ensayo de inhibición del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH^{*}).

Se evaluó la capacidad inhibitoria del radical libre DPPH^{*} siguiendo el protocolo publicado por Brand-Williams *et al.* (1995). Se preparó la solución metanólica de DPPH^{*} ($6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) y se agregó paulativamente metanol al 99% hasta obtener una absorbancia ajustada de 0.7 ± 0.05 a 515 nm. En una microplaca de 96 pocillos se realizaron los siguientes tratamientos por triplicado: control negativo (20 μL de metanol + 200 μL de DPPH^{*}), control estándar (20 μL de antioxidante estándar + 200 μL de DPPH^{*}) y muestra (20 μL de extracto + 200 μL de DPPH^{*}). Se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Se leyeron las absorbancias a 515 nm en un espectrofotómetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron como $\mu\text{mol ET (equivalentes Trolox)}/\text{g PS}$.

IV.8.1.3. Poder reductor antioxidante del ión férrico (FRAP).

Se determinó el potencial reductor siguiendo la metodología propuesta por Benzie y Strain (1996) con algunas modificaciones. Las soluciones madre fueron búfer de acetato de sodio (300 mM, pH 3.6), solución de cloruro férrico (FeCl_3) (20 mM) y solución de TPTZ (2,4,6-tripidil-s-triazina) (10 mM) en HCl (40 mM). Se preparó la solución de trabajo FRAP en una proporción de 10:1:1 (búfer: FeCl_3 :TPTZ). En una microplaca de 96 pocillos se llevaron a cabo por triplicado los siguientes tratamientos: control negativo (20 μL de metanol + 280 μL de FRAP), control estándar (20 μL de antioxidante estándar + 280 μL de FRAP) y muestra (20 μL de extracto + 280 μL de FRAP). Se dejó reposar durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente. Se obtuvieron las densidades ópticas a 638 nm cada 10 min durante una hora en un espectrofotómetro (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Los resultados se reportaron como $\mu\text{mol ET (equivalentes Trolox)}/\text{g PS}$.

IV.8.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea

Los glóbulos rojos (GR), con diferentes antígenos del sistema ABO y RhD, fueron obtenidos de voluntarios adultos sanos entre 20-40 años con previo consentimiento informado. La extracción de sangre se realizó por venopunción y se almacenó en tubos recubiertos con K₂EDTA. La suspensión de eritrocitos se preparó al 10% con aproximadamente 4.7 a 6.1x10⁶ cél·μL⁻¹ y se procesaron para su análisis inmediatamente después de la extracción.

Todos los procesos con sangre humana se realizaron siguiendo las regulaciones mexicanas (NOM-253-SSA1-2012) e internacionales (FDA: CFR - Code of Federal Regulations Title 21, part 640 Additional Standards for human blood and blood product, Support. B Red blood cells, Sec. 640.14 Testing the blood [21CFR640.14]). El laboratorio donde se realizó la extracción está acreditado por ISO-IEC 17025 (NMX-EC-17025) e ISO 15189 elaborado por el comité técnico ISO/TC 212 (Clinical Laboratory Testing and In vitro Diagnostic Systems) tomando como referencia ISO/IEC 17025 e ISO 9001.

La suspensión sanguínea se centrifugó a 1500 rpm durante 10 min y se lavó tres veces con solución isotónica. La suspensión de glóbulos rojos se utilizó en el análisis de sangre de biocompatibilidad y en la evaluación del potencial eritroprotector de los extractos de *P. cruentum*.

El ensayo de biocompatibilidad sanguínea consiste en la inducción de hemólisis con el fin de evaluar la citotoxicidad de los extractos microalgales. Se siguió la metodología descrita por Belokoneva *et al.* (2003). Se incubaron diferentes tratamientos a 37 °C durante 2, 4 y 6 horas: control negativo (150 μL GR + 150 μL PBS), control positivo (150 μL GR + 150 μL Tritón X-100 al 1%) y muestra (150 μL GR + 150 μL de extracto). Se agregó 1 mL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. Se colocaron 300 μL del sobrenadante de cada tratamiento por triplicado en una microplaca de 96 pocillos. Se midió la densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los resultados se reportaron como porcentaje de hemólisis (PH) mediante la Ec. 7.

$$\text{Ec. 7: PH} = [(A_{\text{Muestra}} - A_{\text{PBS}}) / (A_{\text{Tritón}} - A_{\text{PBS}})] \cdot 100$$

Donde A_{Muestra} es la absorbancia de la muestra, A_{PBS} es la absorbancia del control negativo y $A_{\text{Tritón}}$ la absorbancia del control positivo.

IV.8.3. Evaluación del potencial eritroprotector

Se evaluó el potencial eritroprotector de los extractos (solución fisiológica, Tris HCl 0.5 M y metanol al 99%) por medio de los ensayos de inhibición de hemólisis oxidativa, osmótica y por calor, siguiendo el protocolo de procesamiento de muestras sanguíneas del ensayo de biocompatibilidad sanguínea. Los resultados se informaron como porcentaje de inhibición de hemólisis (PIH) con la Ec. 8.

$$\text{Ec. 7: PIH} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Muestra}}) / (A_{\text{Control}})] \cdot 100$$

Donde A_{Control} es la absorbancia del control positivo y A_{Muestra} es la absorbancia de la muestra.

IV.8.3.1. Actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamidina) (AAPH)

La hemólisis oxidativa se indujo con el compuesto AAPH, que figura como un iniciador de radicales libres, a partir de los métodos propuestos por Liu y Huang (2015) y Hernández-Ruiz *et al.* (2018). En una microplaca de 96 pocillos se colocaron por triplicado el control negativo (100 μL de GR + 200 μL de PBS), control positivo (100 μL de GR + 100 μL de PBS + 100 μL de AAPH) y muestra (100 μL de GR + 100 μL de extracto + 100 μL de AAPH). Se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 3 h (Boekel Scientific, modelo 132000). Se midió la densidad óptica a 540 nm en un lector de microplaca (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Se evaluó el efecto eritroprotector por una tinción Wright bajo microscopía óptica. Se preparó la solución Wright con el reactivo, adicionando solución fisiológica. Se identificaron los cambios morfológicos de la membrana celular de los eritrocitos ocurridos en los diferentes extractos.

IV.8.3.2. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad

La hemólisis inducida por hipotonicidad se llevó a cabo siguiendo la metodología de Agarwal y Shanmugam (2019) con algunas modificaciones. Los tratamientos se incubaron en baño de agua a 37 °C durante 30 min: muestra (50 µL de GR + 100 µL de extracto + 100 µL de PBS + 200 µL de solución hiposalina), control negativo (50 µL de GR + 400 µL de PBS), control positivo (50 µL de GR + 200 µL de PBS + 200 µL de solución hiposalina) y control estándar (50 µL de GR + 100 µL de diclofenaco sódico ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + 100 µL de PBS + 200 µL de solución hiposalina). Después de la incubación, se añadieron 850 µL de PBS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 300 µL del sobrenadante recuperado de cada tratamiento en una microplaca de 96 pocillos por triplicado. Se tomó la lectura de la absorbancia a 560 nm en el lector de microplaca (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

IV.8.3.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor

La hemólisis inducida por calor se ejecutó de acuerdo con la metodología de Agarwal y Shanmugam (2019) con algunas modificaciones. Se prepararon los tratamientos: muestra (150 µL de GR + 150 µL de extracto), control positivo (150 µL de GR + 150 µL de PBS), control negativo (150 µL de GR + 150 µL de PBS) y control estándar (150 µL de GR + 150 µL de diclofenaco sódico ($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)). Se incubaron todos los tratamientos, excepto el control negativo, a 55 °C durante 30 min en un baño de agua. Después de la incubación se agregó 1 mL de PBS a cada muestra y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se colocó por triplicado una cantidad de 300 µL de sobrenadante de cada tratamiento en una microplaca de 96 pocillos. Se registró la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Multiskan Go, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

IV.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software JMP v16. Se realizó un análisis estadístico descriptivo de los resultados de la concentración celular de *P. cruentum*. Se aplicó una prueba de homogeneidad y normalidad a los resultados de la cuantificación de pigmentos, ensayo de

biocompatibilidad sanguínea y actividades biológicas (actividad antioxidante y potencial eritroprotector); posteriormente un análisis de varianza (ANOVA) con una prueba de Tukey como análisis *post hoc*, a un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$). Se realizó un análisis de correlación de Pearson a los resultados de los diferentes ensayos de actividad antioxidante (ABTS⁺, DPPH[•] y FRAP).

V. RESULTADOS

V.1. Cinética de crecimiento

La cinética de crecimiento de la microalga mostró un comportamiento sigmoideal, esto se puede observar en la Figura 8. Con los resultados de la concentración celular promedio se determinó el día de 10 cultivo como punto de cosecha, el cual corresponde al inicio de la fase estacionaria, con una concentración celular promedio de $2,358,899 \pm 336,481 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$, que equivale a $21.16 \pm 0.20 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ en $\log_2 (\text{cél}\cdot\text{mL}^{-1})$.

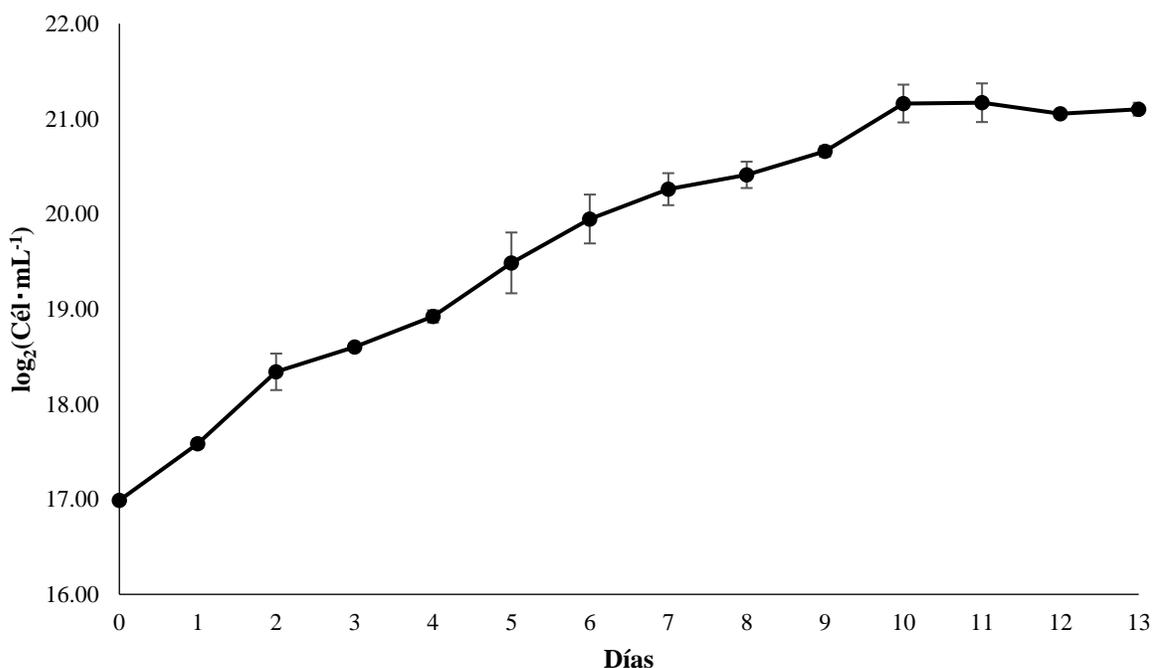


Figura 8. Cinética de crecimiento de *P. cruentum* ($\log_2 \text{cél}\cdot\text{mL}^{-1}$).

V.2. Cuantificación de pigmentos

Las concentraciones de ficobiliproteínas fueron significativamente diferentes en el extracto de T-HCl; en el caso del extracto de solución fisiológica, no hubo diferencias significativas entre la R-FC y AFC. La B-FE mostró la concentración mayor en ambos extractos. Asimismo, la AFC

fue la única FBP que no mostró diferencias significativas entre los extractos (Tabla 5). Por otro lado, las concentraciones de clorofilas y carotenoides totales fueron relativamente bajas (Tabla 6).

Tabla 5. Concentración de ficobiliproteínas de los extractos acuosos provenientes de *P. cruentum* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS).

	T-HCl	SF
B-FE	71.00 ^{Aa} ±2.65	53.64 ^{Ba} ±2.01
R-FC	37.56 ^{Ab} ±0.87	30.60 ^{Bb} ±1.90
AFC	32.21 ^{Ac} ±1.14	30.14 ^{Ab} ±2.87

Los datos se muestran como la media±DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n\geq 3$). Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Letras mayúsculas distintas representan diferencias significativas en las concentraciones de ficobiliproteínas de los extractos entre columnas ($p<0.001$). Letras minúsculas distintas representan diferencias significativas en las concentraciones de ficobiliproteínas entre filas de cada extracto ($p<0.001$).

Tabla 6. Concentración de clorofilas y carotenoides totales del extracto metanólico de *P. cruentum* ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS).

	Concentración
Clorofilas totales	7.78 ^a ±0.63
Carotenoides totales	0.49 ^b ±0.14

Los datos se muestran como la media±DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n\geq 3$). Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Letras distintas representan diferencias significativas ($p<0.001$).

V.3. Determinación cuantitativa de proteínas

La concentración proteica de los extractos acuosos se muestra en la Tabla 7; donde, la concentración del extracto de SF fue significativamente mayor que la del extracto de T-HCl.

Tabla 7. Concentración de proteína de los extractos acuosos provenientes de *P. cruentum* ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

	Concentración
SF	45.65 ^a ±0.46
T-HCl	16.66 ^b ±0.75

Los datos se muestran como la media±DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n\geq 3$). Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Letras distintas representan diferencias significativas ($p<0.001$).

V.4. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas

V.4.1. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante proporcionada por los extractos fue significativamente diferente para cada método ($p<0.001$). El extracto de SF mostró una mayor actividad antioxidante por el método de ABTS⁺, mientras que el de T-HCl y MetOH por DPPH[•]. Asimismo, el extracto MetOH fue el que presentó una mayor actividad antioxidante por FRAP. Los resultados de la actividad antioxidante se encuentran condensados en la Tabla 8.

El coeficiente de correlación de Pearson de los resultados de los ensayos FRAP y DPPH[•] fue mayor de 0.95 para los extractos acuosos (Figura 9). Por lo contrario, no existe una correlación entre los mecanismos antioxidantes del ensayo FRAP y ABTS⁺ (Figura 10). El coeficiente de correlación de Pearson de los resultados de los ensayos ABTS⁺ y DPPH[•] fueron mayores de 0.95 en los extractos de MetOH y T-HCl (Figura 11).

Tabla 8. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de *P. cruentum* ($\mu\text{mol ET}\cdot\text{g}^{-1}\text{ PS}$).

	ABTS ⁺⁺	DPPH [*]	FRAP
Solución fisiológica	1238.49 ^{Aa} ±20.51	344.22 ^{Bc} ±05.82	335.57 ^{Bc} ±06.68
Tris HCl 0.5 M	1186.64 ^{Bb} ±18.24	1385.65 ^{Aa} ±22.04	374.30 ^{Cb} ±27.30
Metanol al 99%	761.80 ^{Bc} ±21.00	1318.72 ^{Ab} ±14.52	433.10 ^{Ca} ±43.40

Los datos se muestran como la media±DE (desviación estándar) de al menos tres repeticiones ($n\geq 3$). Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional. Letras mayúsculas distintas representan diferencias significativas de los bioensayos para cada extracto entre columnas ($p<0.001$). Letras minúsculas distintas representan diferencias significativas de los extractos de cada bioensayo entre filas ($p<0.001$).

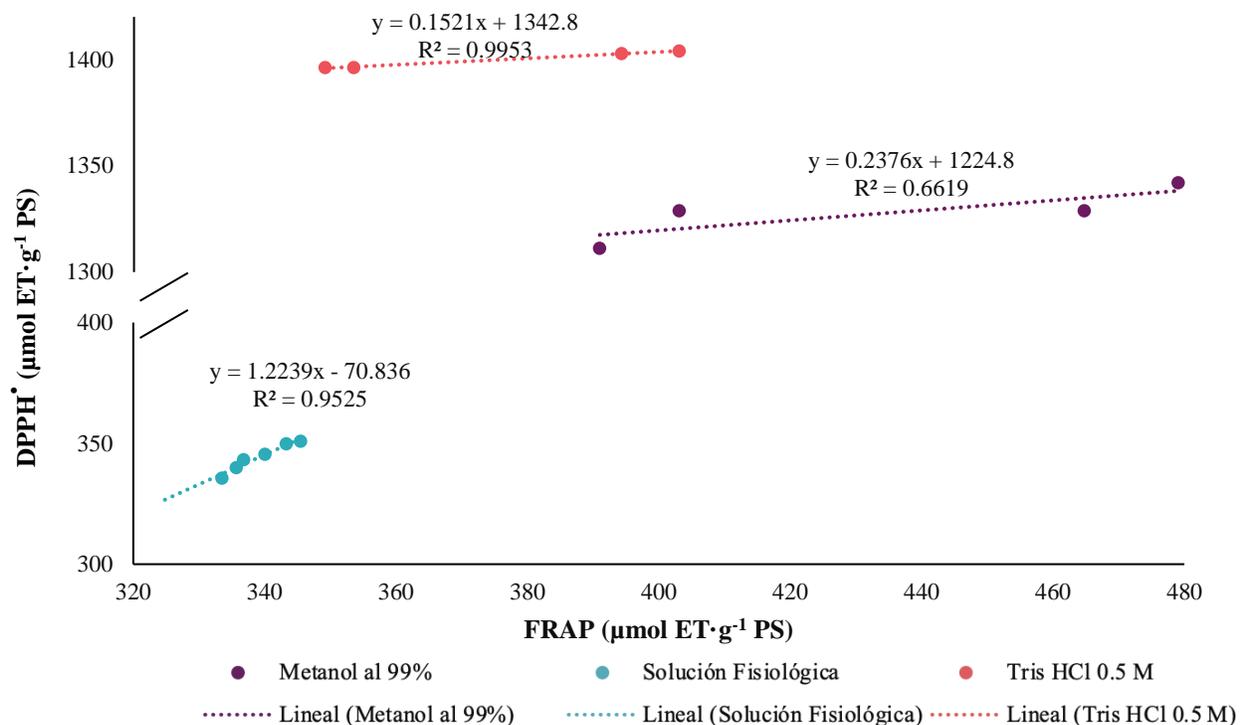


Figura 9. Correlación de Pearson de los ensayos de FRAP y DPPH^{*} del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.

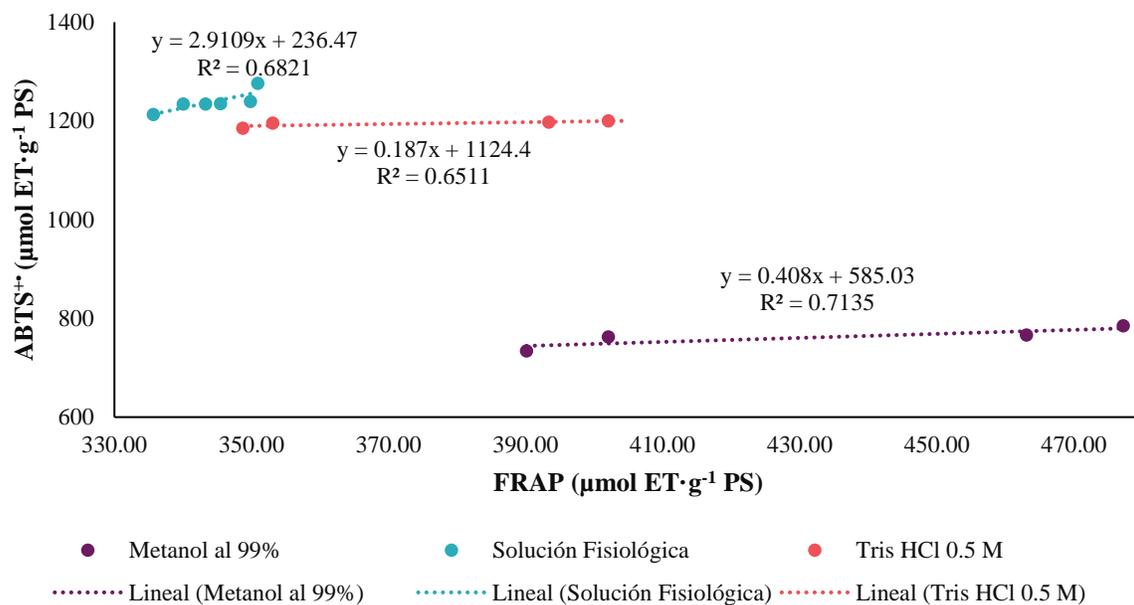


Figura 10. Correlación de Pearson de los ensayos de FRAP y ABTS^{•+} del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.

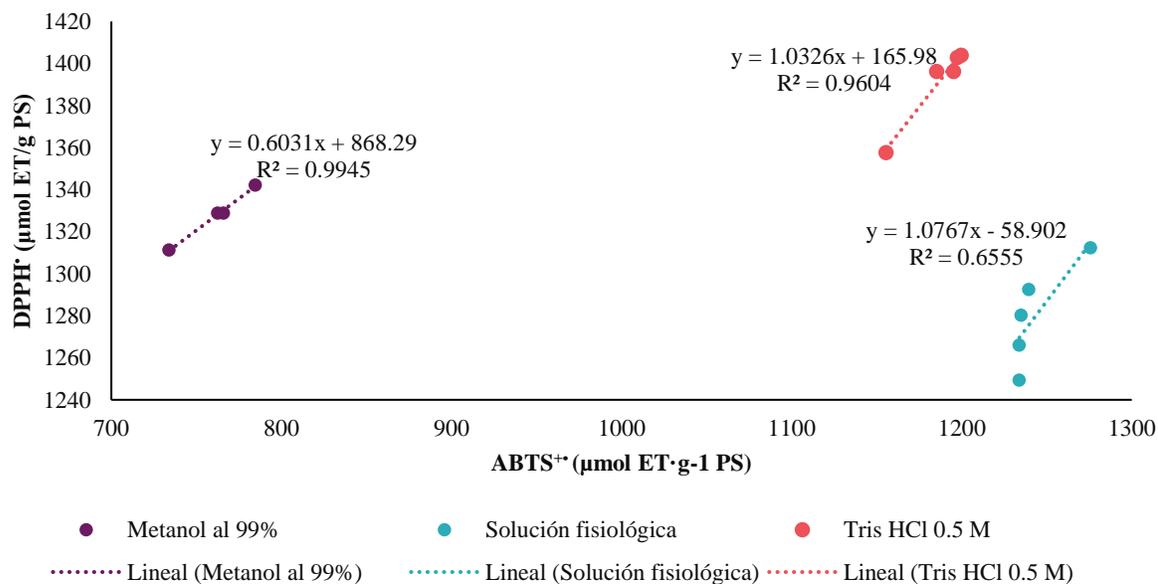


Figura 11. Correlación de Pearson de los ensayos de ABTS^{•+} y DPPH[•] del extracto de metanol al 99%, solución fisiológica y Tris HCl 0.5 M.

V.4.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea

Los resultados del ensayo de biocompatibilidad sanguínea de los extractos acuosos (SF y T-HCl) y del extracto metanólico de los antígenos ABO y de los grupos A, O y AB con RhD positivo y negativo se muestran en la Figura 12, 13, 14 y 15, respectivamente. La evaluación de los resultados del ensayo de biocompatibilidad sanguínea está basada en el límite crítico de hemólisis, el cual debe ser inferior al 5% (ISO/TR 7406). Con ese criterio, se determinó que los extractos acuosos son inocuos sobre los grupos A⁺, B⁺ y O⁺, ya que no rebasaron el límite crítico de hemólisis, con excepción del extracto de SF sobre el grupo B⁺ y los dos extractos acuosos sobre el grupo AB⁺, no obstante, el daño desarrollado se considera mínimo y estable, porque este no aumentó entre la hora 4 y 6 de exposición.

Los resultados del ensayo de biocompatibilidad sanguínea de todos los extractos sobre los grupos A, O y AB con RhD positivo y negativo exhibieron tendencias distintas. Todos los extractos fueron inocuos sobre el antígeno A. La ausencia del RhD, o bien, el RhD negativo del grupo O parece afectar la biocompatibilidad sanguínea del extracto de SF, pero el porcentaje de hemólisis no aumentó entre la hora 4 y 6. Una explicación alternativa es que la presencia del RhD o un RhD positivo sea el que fomente el efecto eritroprotector del extracto. Se superó el límite crítico de hemólisis en el grupo AB⁺ en la evaluación de los extractos de SF y T-HCl, aunque este no mostró diferencias significativas entre la hora 4 y 6, y entre la hora 2 y 6 de exposición, respectivamente, por lo tanto, el grupo B y/o la presencia del RhD podrían afectar la protección de la membrana de los eritrocitos.

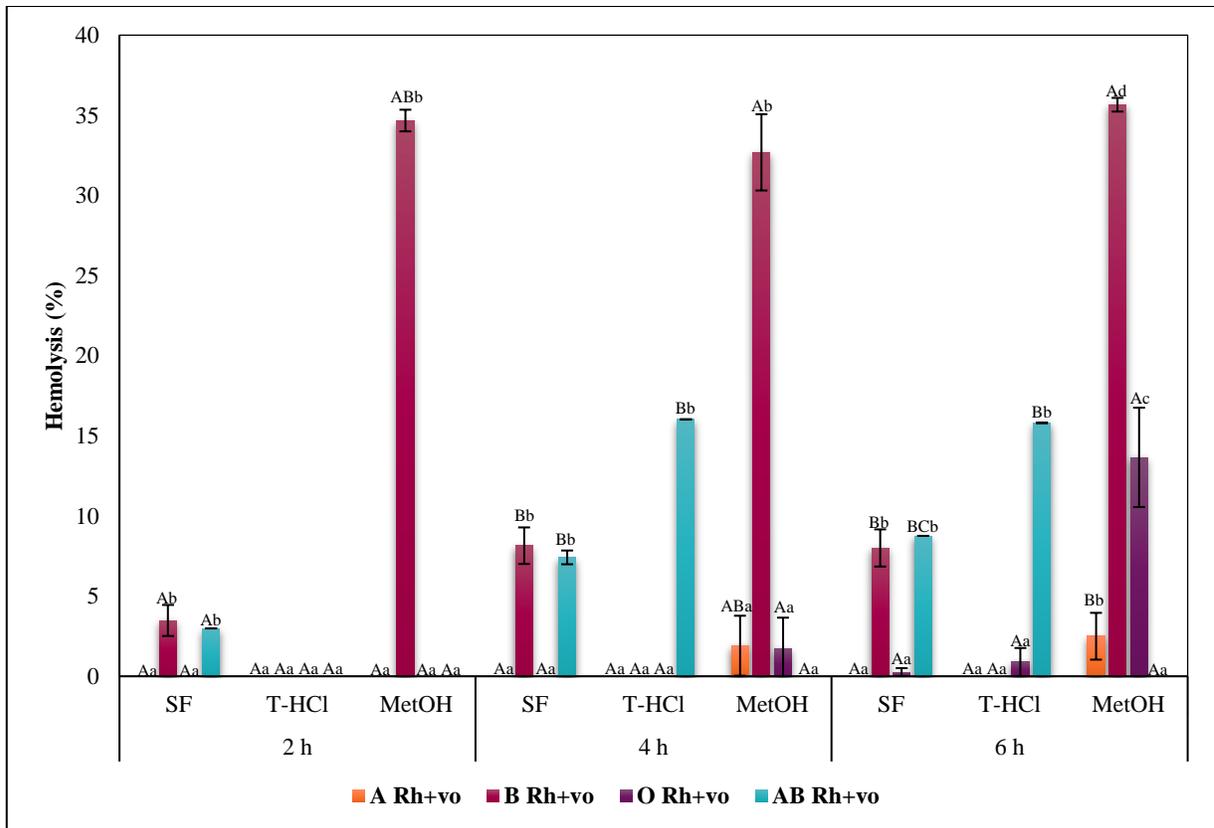


Figura 12. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos, asteriscos representan porcentaje de hemólisis nulo ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre extracto por cada periodo de exposición. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

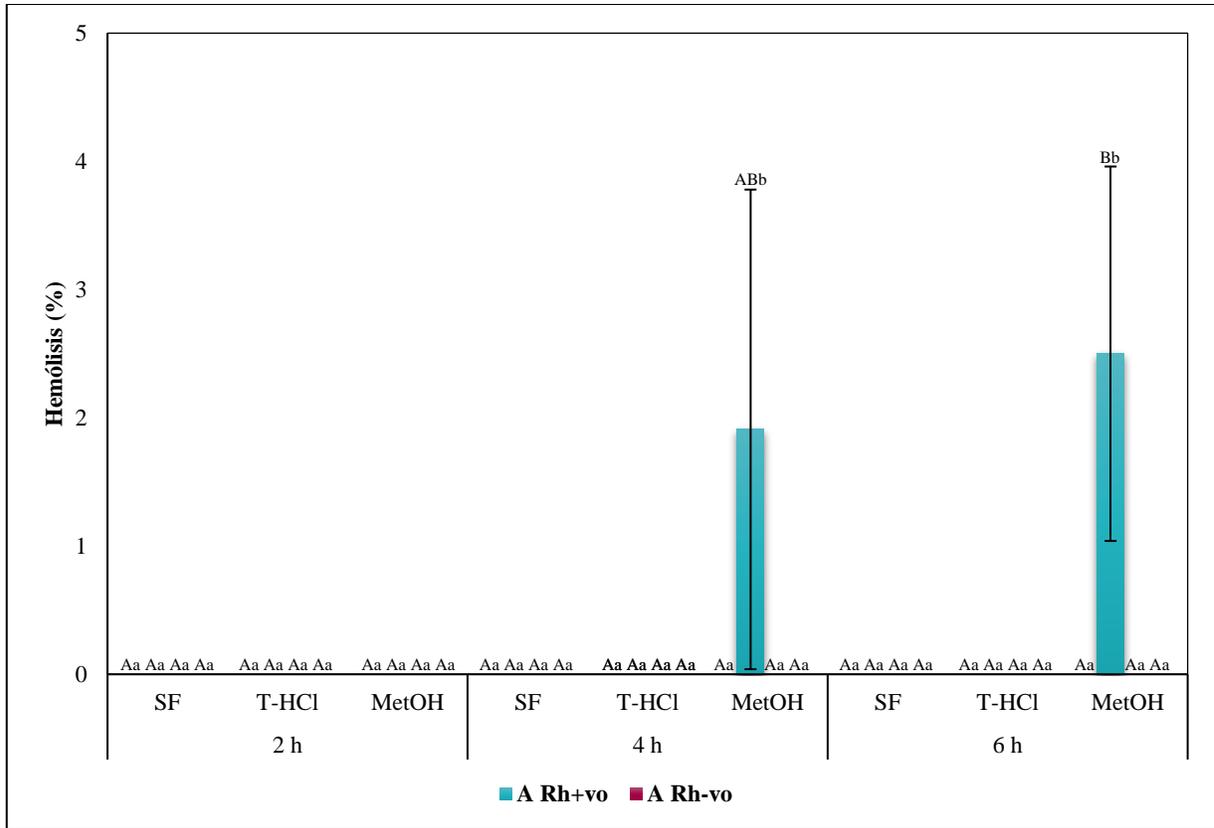


Figura 13. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo A. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre extracto por cada periodo de exposición. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

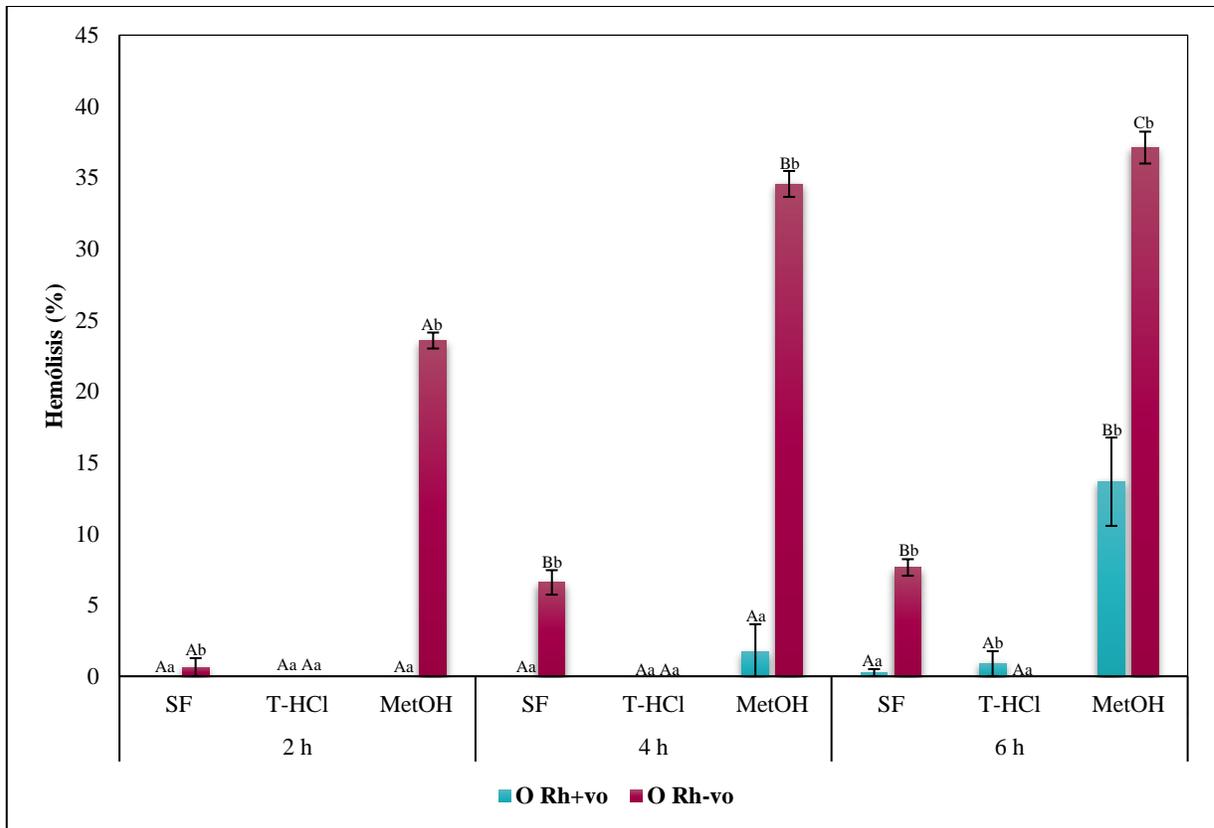


Figura 14. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo O. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre extracto por cada periodo de exposición. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

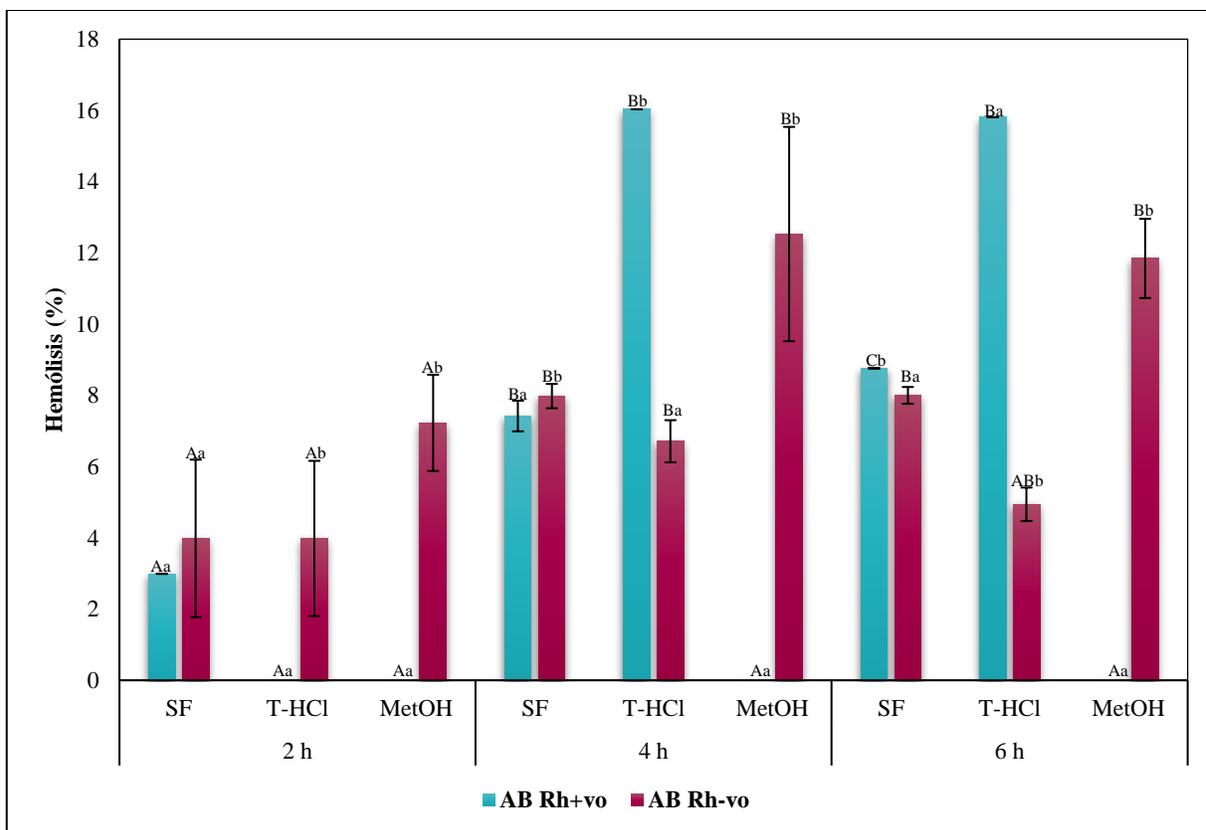


Figura 15. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea de extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo AB. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre extracto por cada periodo de exposición. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

La biocompatibilidad sanguínea del extracto metanólico sólo fue idónea sobre el antígeno A y el grupo AB⁺, donde el porcentaje de hemólisis fue menor al 5%. El antígeno que presentó un mayor porcentaje de hemólisis por su interacción con el extracto metanólico fue el B, a pesar de ello, este no aumentó entre la hora 2 y 6. El porcentaje de hemólisis detectado del extracto metanólico aumentó en el lapso del ensayo en el grupo O, mientras que este se mantuvo entre la hora 4 y 6 en el grupo AB⁺, tanto en el RhD positivo como negativo.

V.4.3. Evaluación del potencial eritroprotector

Los extractos microalgales mostraron un potencial eritroprotector en la hemólisis inducida por los radicales producidos por AAPH, hipotonicidad y calor. Estos dependieron del bioensayo evaluado, así como a los antígenos del sistema ABO y RhD presentes en la superficie celular.

V.4.3.1. Determinación de la actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH)

Los extractos microalgales fueron capaces de inhibir a las especies reactivas sintetizadas a partir del AAPH de manera diferencial, dependiendo de los grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD. En el grupo A, los extractos microalgales brindaron un mayor porcentaje de inhibición de hemólisis, superando al proporcionado por los antioxidantes estándares AA, BTC y FXA; en cambio, en los grupos B y AB, la inhibición de hemólisis resultante de los extractos acuosos fue significativamente menor. Por otra parte, el extracto MetOH ejerció la mayor actividad antihemolítica en todos los grupos sanguíneos (Figura 16).

La evaluación de la influencia del RhD en la capacidad antihemolítica de los extractos indica que los extractos acuosos tuvieron un mayor efecto eritroprotector en el grupo A⁺ en comparación con el grupo A⁻ (Figura 17). Asimismo, el extracto MetOH generó el mayor efecto eritroprotector en el grupo O⁺ y el de T-HCl en el O⁻, ambos equivalentes al de la FXA (Figura 18). En el caso del grupo AB⁺, el extracto MetOH desempeñó una mayor función antihemolítica que los extractos acuosos, equivalente a la de los antioxidantes estándares, con resultados más favorables en el grupo AB⁺ (Figura 19).

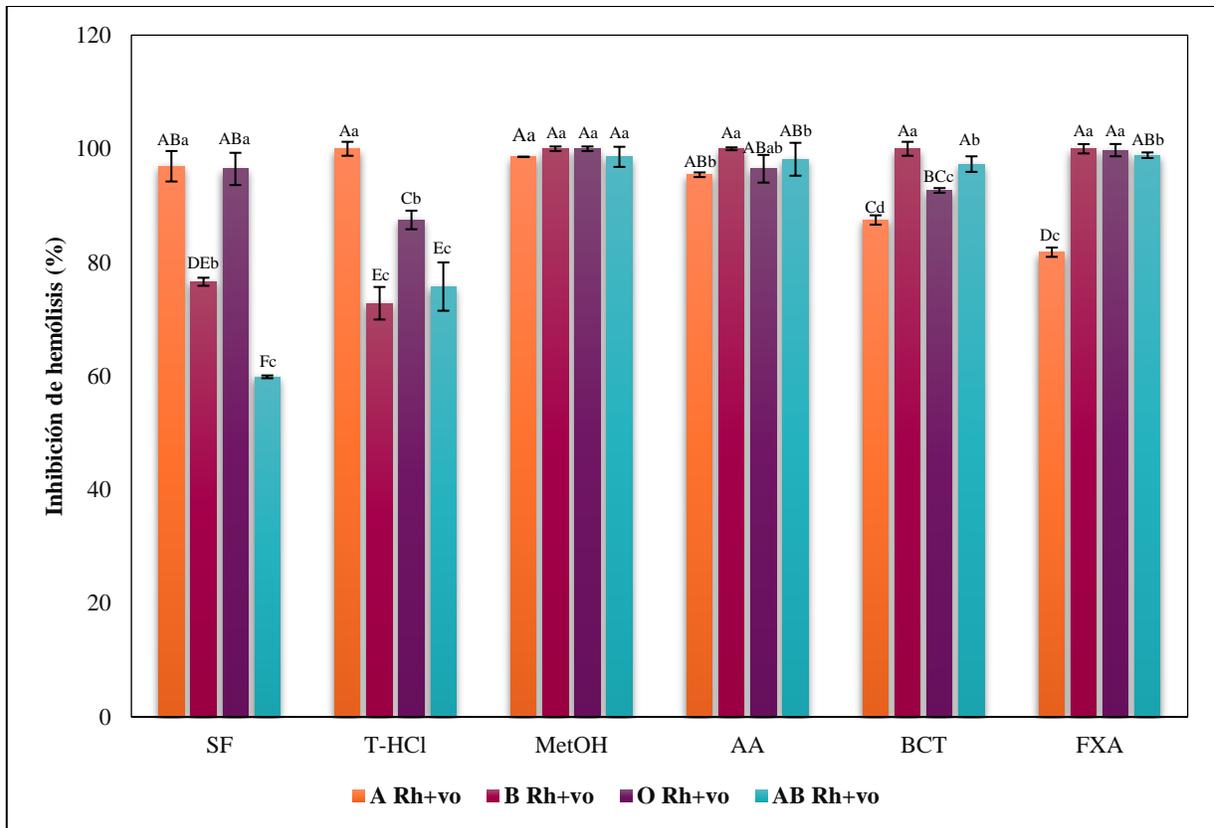


Figura 16. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

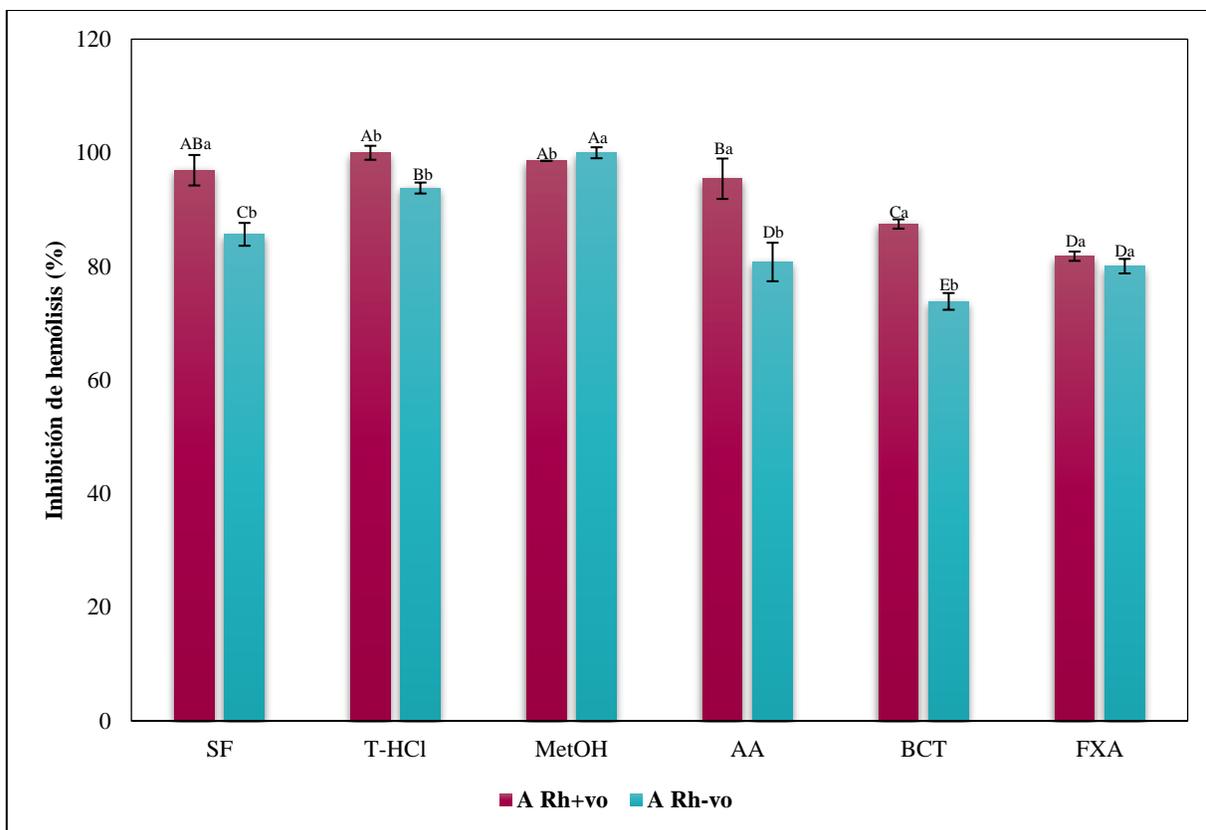


Figura 17. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo A. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

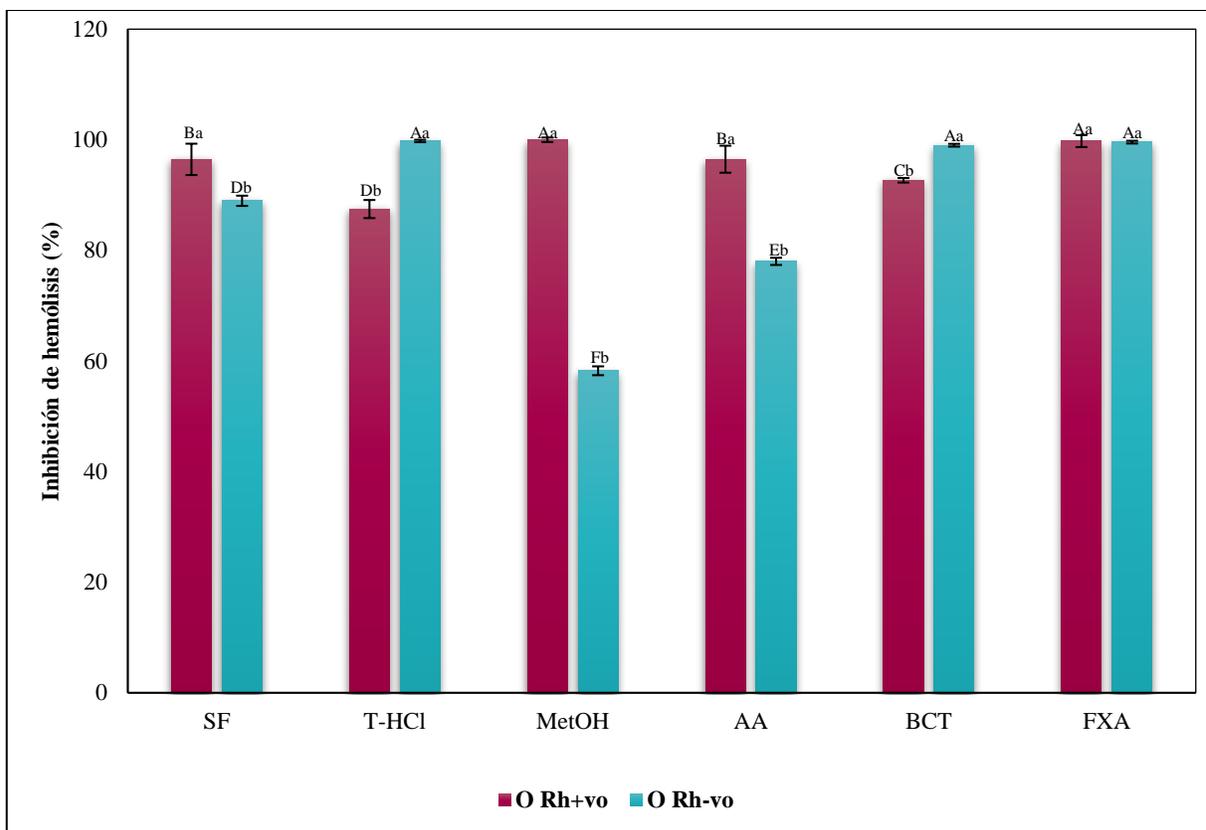


Figura 18. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo O. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

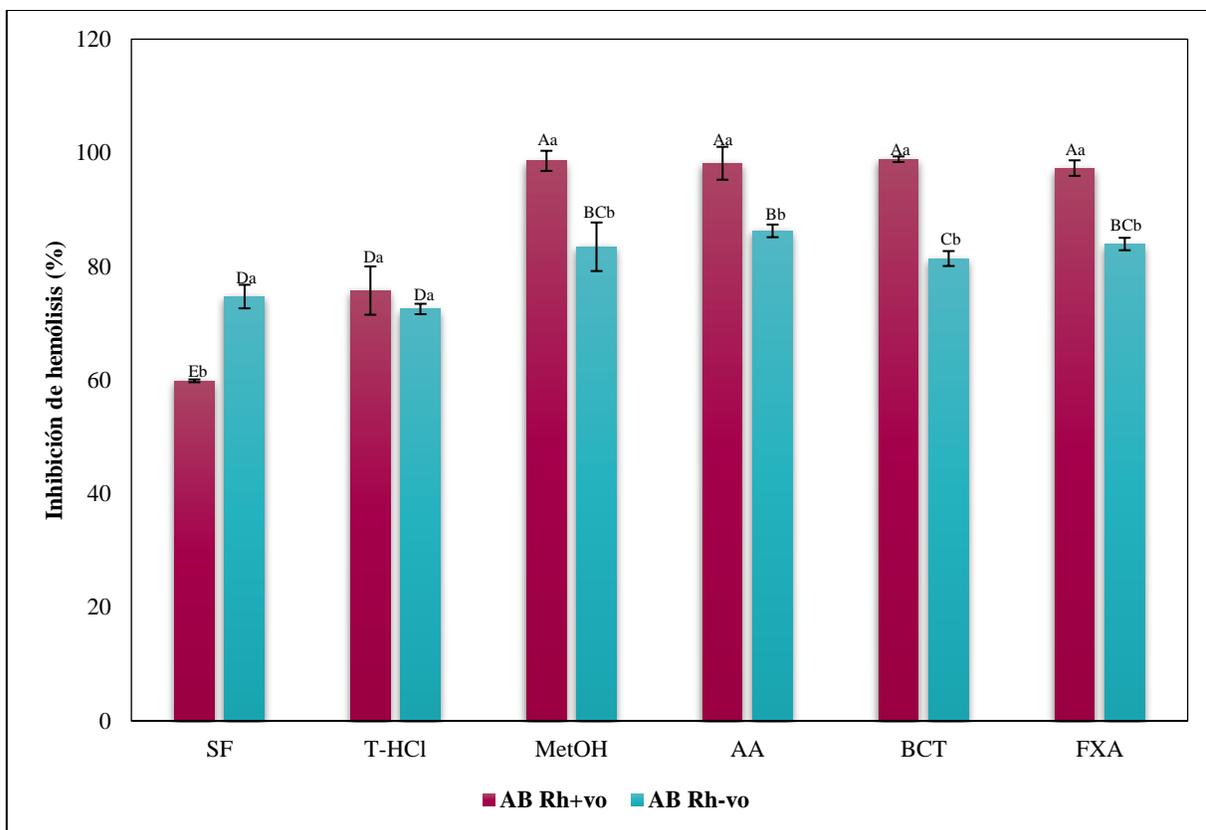


Figura 19. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por AAPH de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) del grupo AB. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

V.4.3.2. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad

Los resultados del ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad sobre los antígenos ABO tuvieron un comportamiento similar en los diferentes grupos sanguíneos (Figura 20). De esta manera, el grupo sanguíneo que desarrolló una mayor protección eritroprotectora por acción de todos los extractos fue el O, seguido del B y A, mientras que el grupo AB mostró un comportamiento variable, superando al A sólo en el tratamiento del extracto de T-HCl y DS, pero el efecto fue menor en comparación con el resto de los grupos con cada uno de los extractos.

La inhibición de la hemólisis inducida por hipotonicidad sobre el RhD fue complementaria, ya que existen diferencias significativas de los resultados correspondientes al RhD positivo y negativo de todos los grupos evaluados. De tal forma que en el grupo A⁺ los extractos acuosos tuvieron un mayor efecto inhibitorio de la hemólisis que en el grupo A⁻, el cual resultó más beneficiado del extracto MetOH (Figura 21). En el grupo O, la inhibición de la hemólisis de los extractos acuosos fue independiente, mientras que se desarrolló una mayor protección de los eritrocitos en el grupo O⁺ con el extracto de T-HCl, en el grupo O⁻ fue con el de SF y MetOH (Figura 22). El grupo AB⁻ mostró un mayor porcentaje de inhibición de hemólisis con todos los extractos y con el DS en comparación con el AB⁺ (Figura 23).

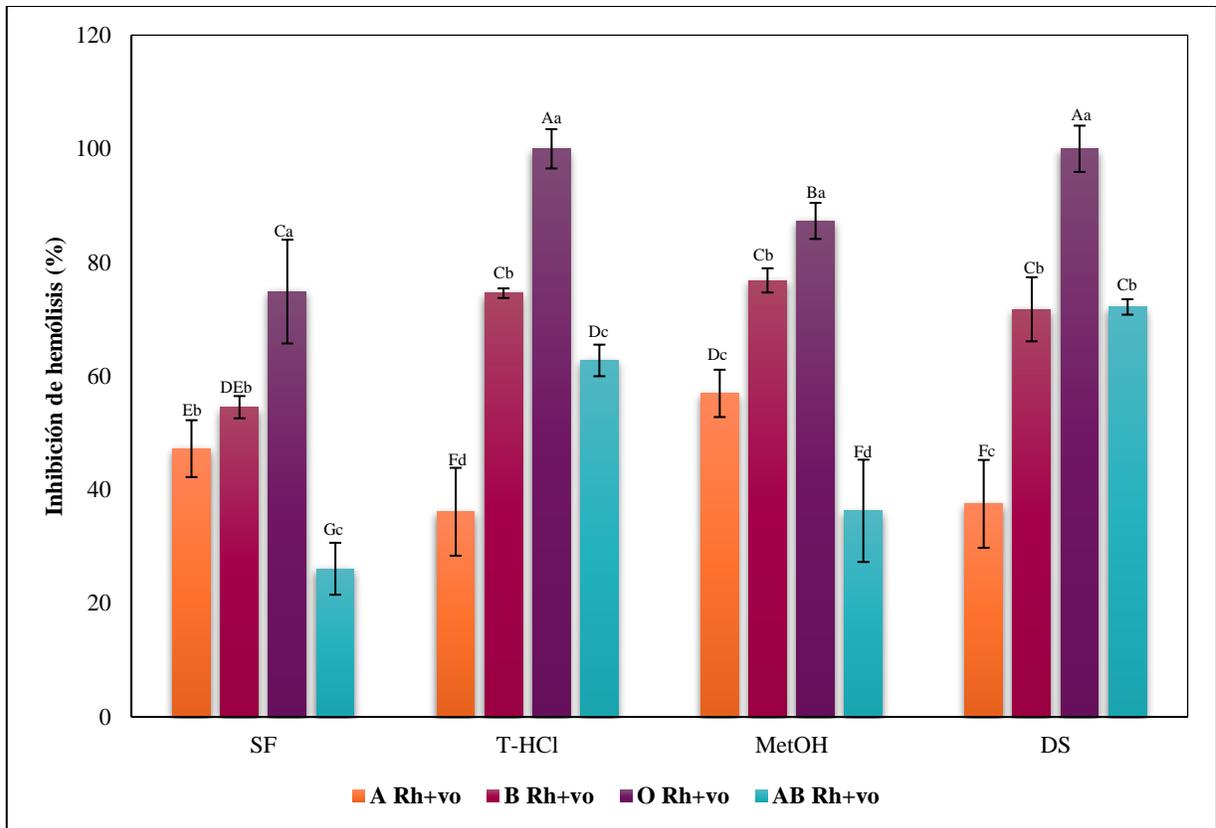


Figura 20. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%.

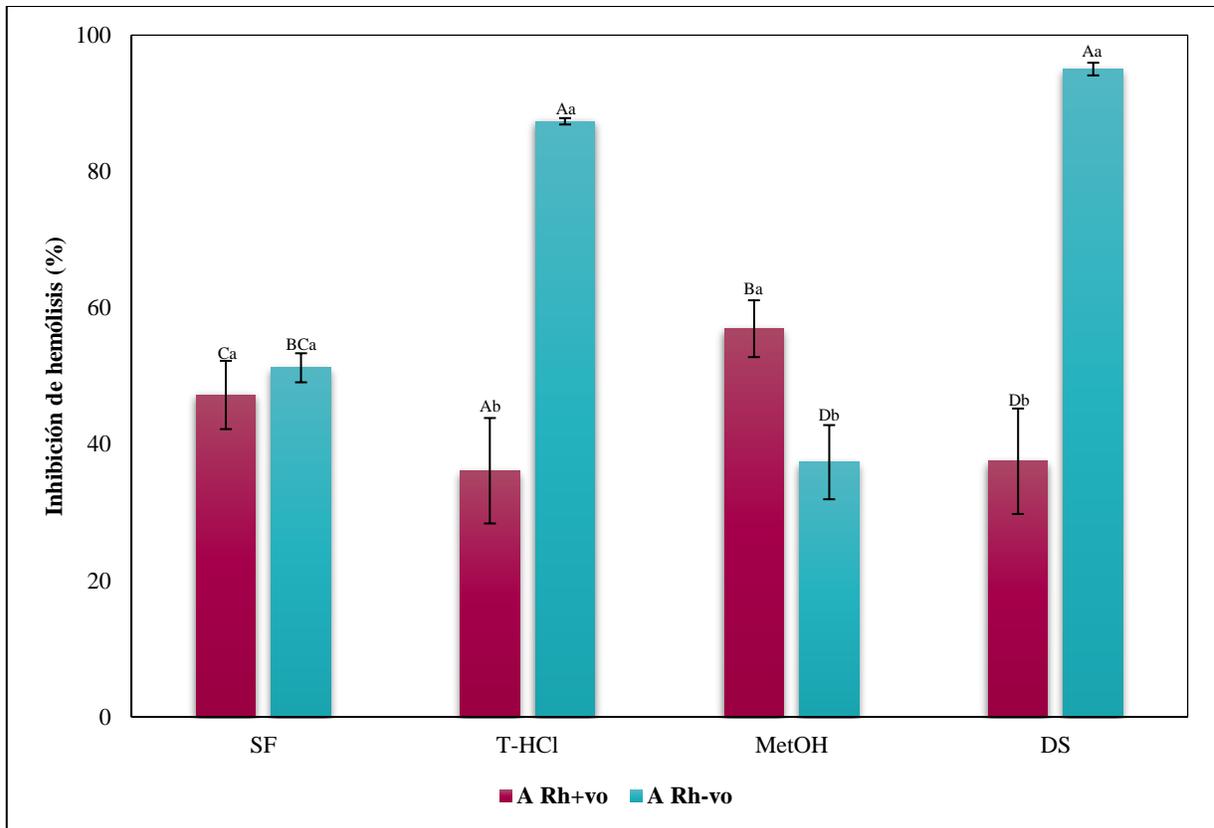


Figura 21. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo A. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; DS, diclofenaco de sodio.

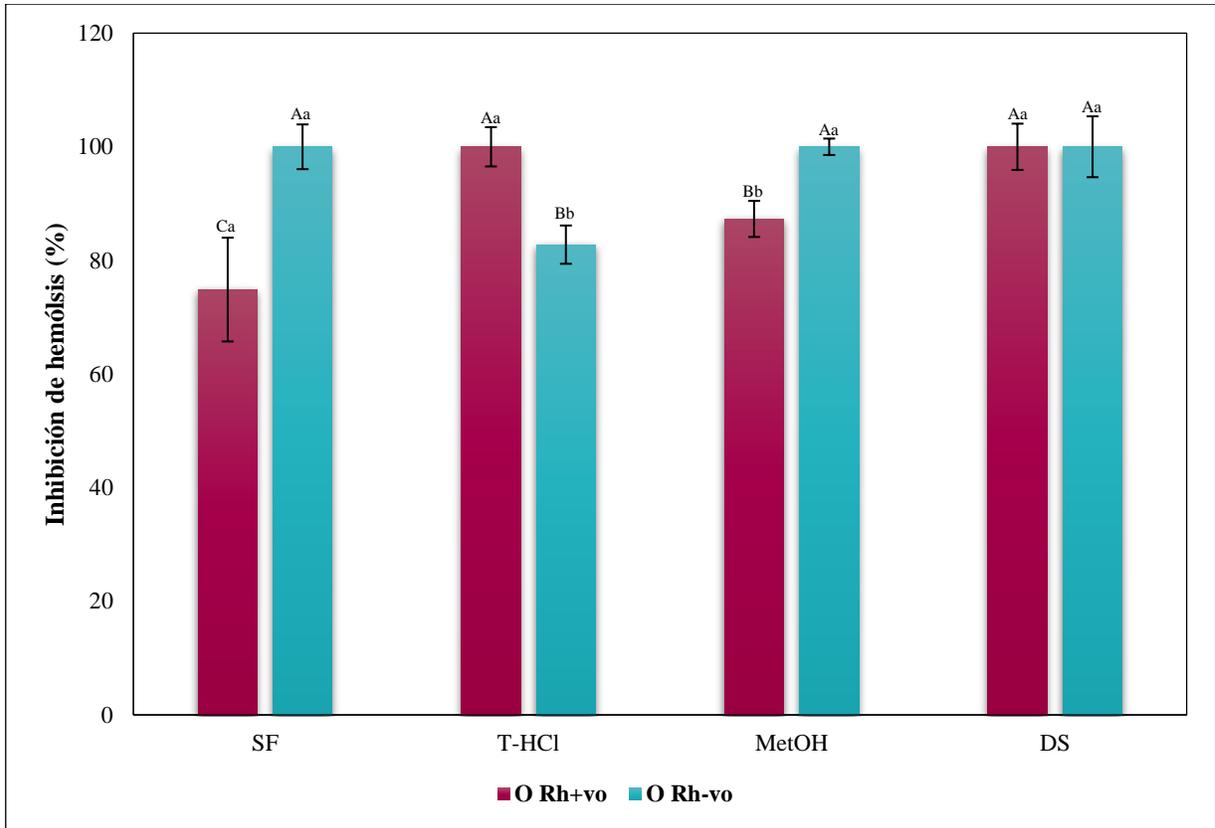


Figura 22. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo O. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; DS, diclofenaco de sodio.

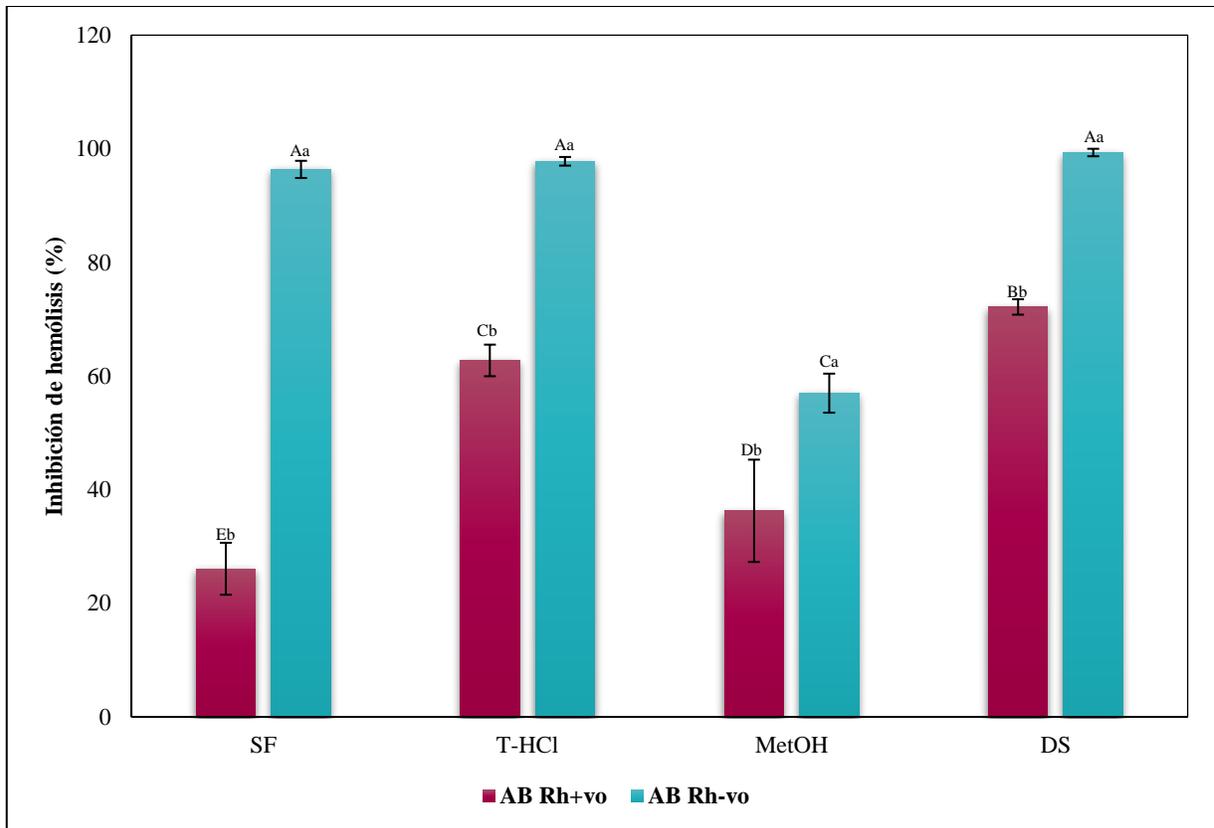


Figura 23. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por hipotonicidad de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo AB. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; DS, diclofenaco de sodio.

V.4.3.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor

La inhibición de la hemólisis inducida por calor mediante los diferentes extractos microalgales fue heterogénea en todos los grupos sanguíneos (Figuras 24-27). Los extractos acuosos fueron responsables de una inhibición de la hemólisis menor al 40% en todos los grupos sanguíneos, resultados menores que en el resto de los ensayos. El extracto de SF desempeñó una mayor protección eritroprotectora en los grupos A y O, y de manera complementaria, el extracto de T-HCl en el grupo B, aunque no previno la hemólisis en el grupo AB, no obstante, este grupo fue el que desarrolló una mayor capacidad inhibitoria de la hemólisis con el extracto MetOH, al cual se le atribuyen los mejores resultados del presente ensayo, superiores al del DS.

Considerando el RhD, los resultados que indicaron una mayor capacidad inhibitoria de la hemólisis fueron los efectuados por el extracto MetOH para los grupos A⁺, A⁻, AB⁺, AB⁻ y O⁺. En cambio, en el grupo O⁻ no se detectaron diferencias significativas del porcentaje de inhibición de la hemólisis desencadenado por el extracto de MetOH y el de T-HCl.

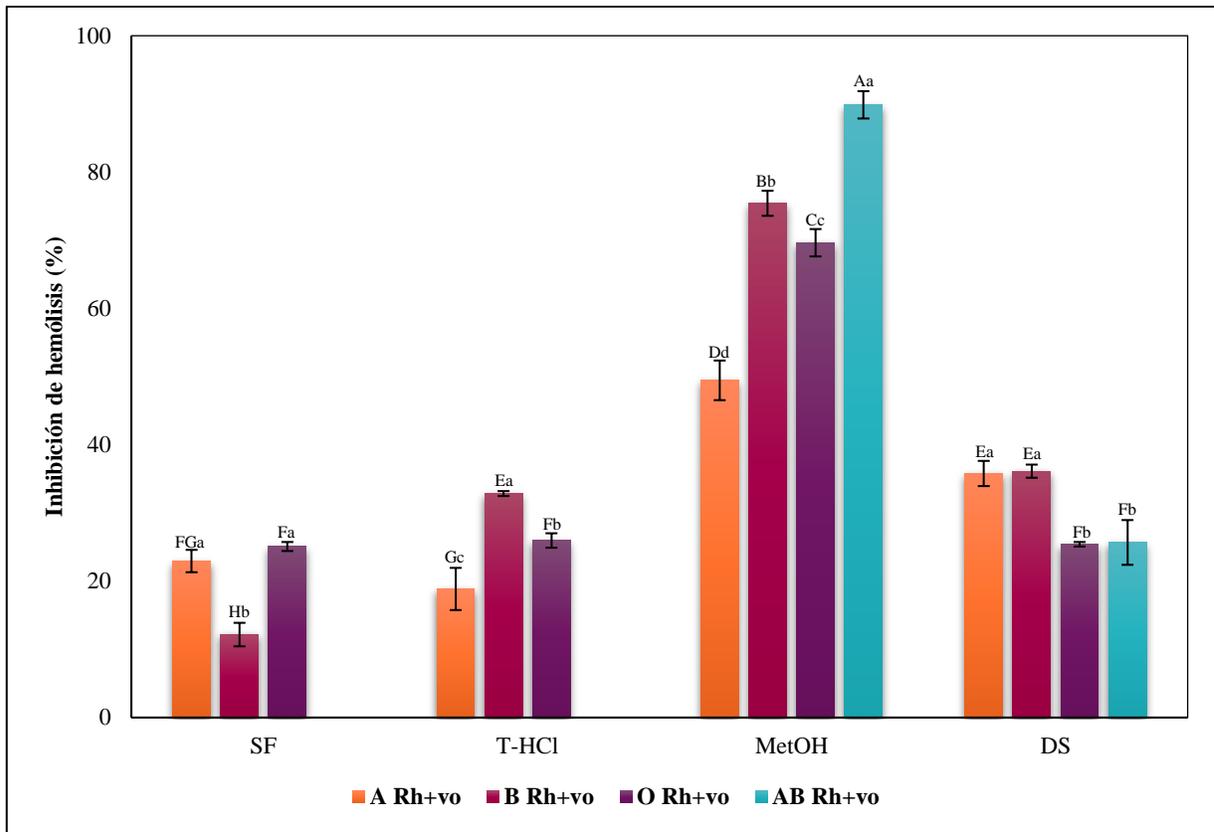


Figura 24. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes grupos sanguíneos ABO. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

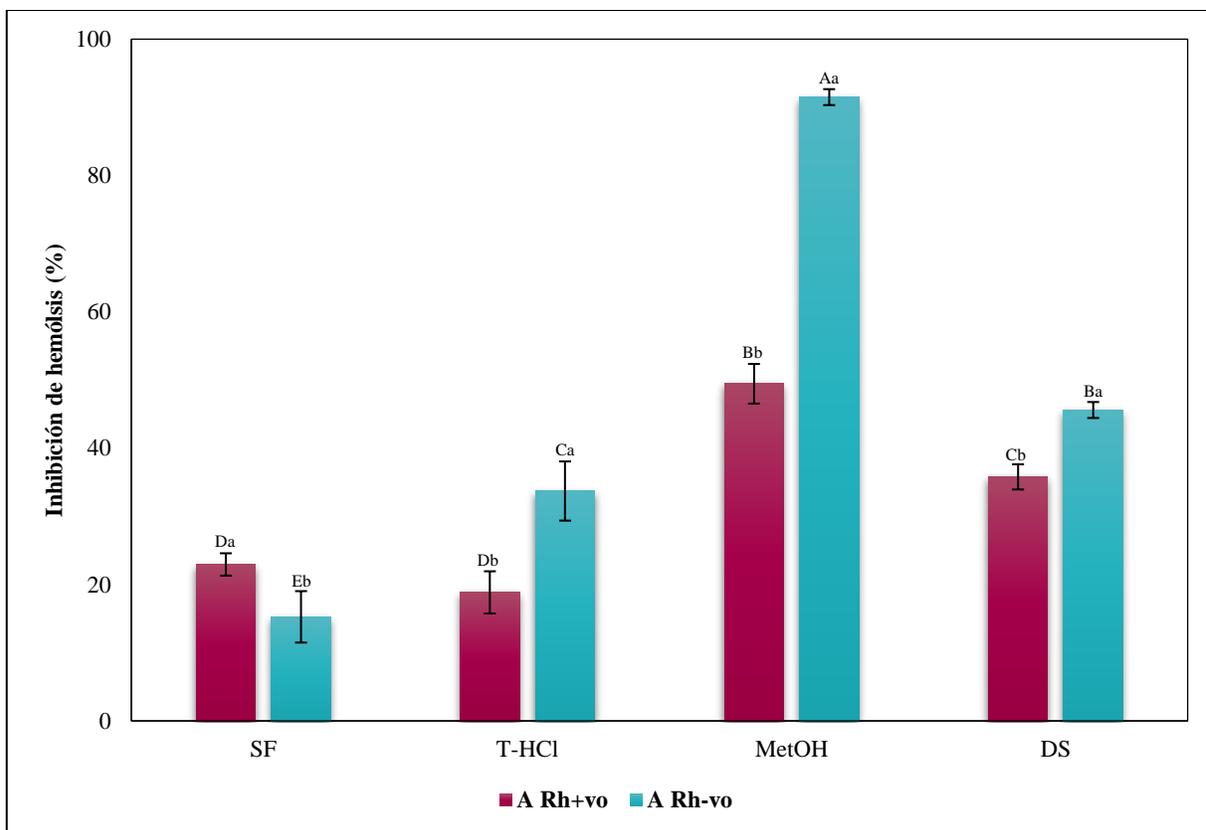


Figura 25. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo A. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

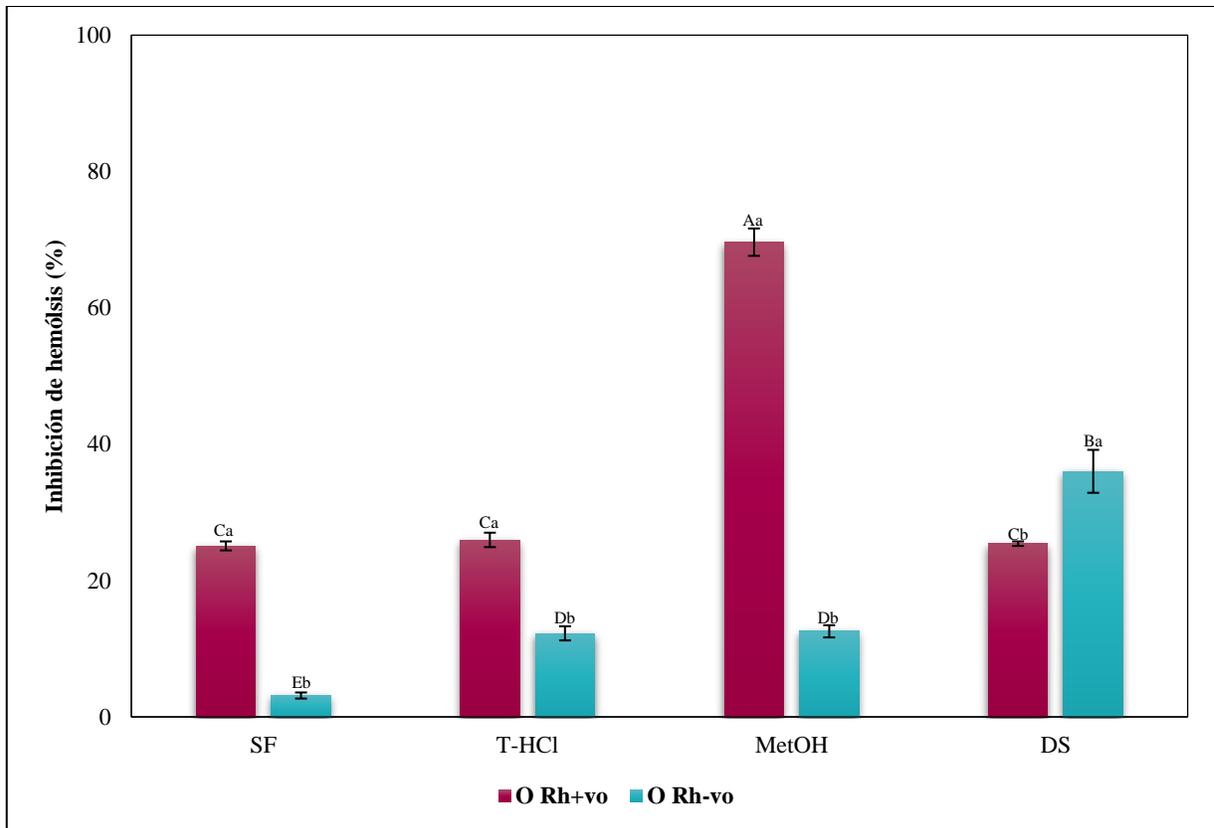


Figura 26. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo O. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

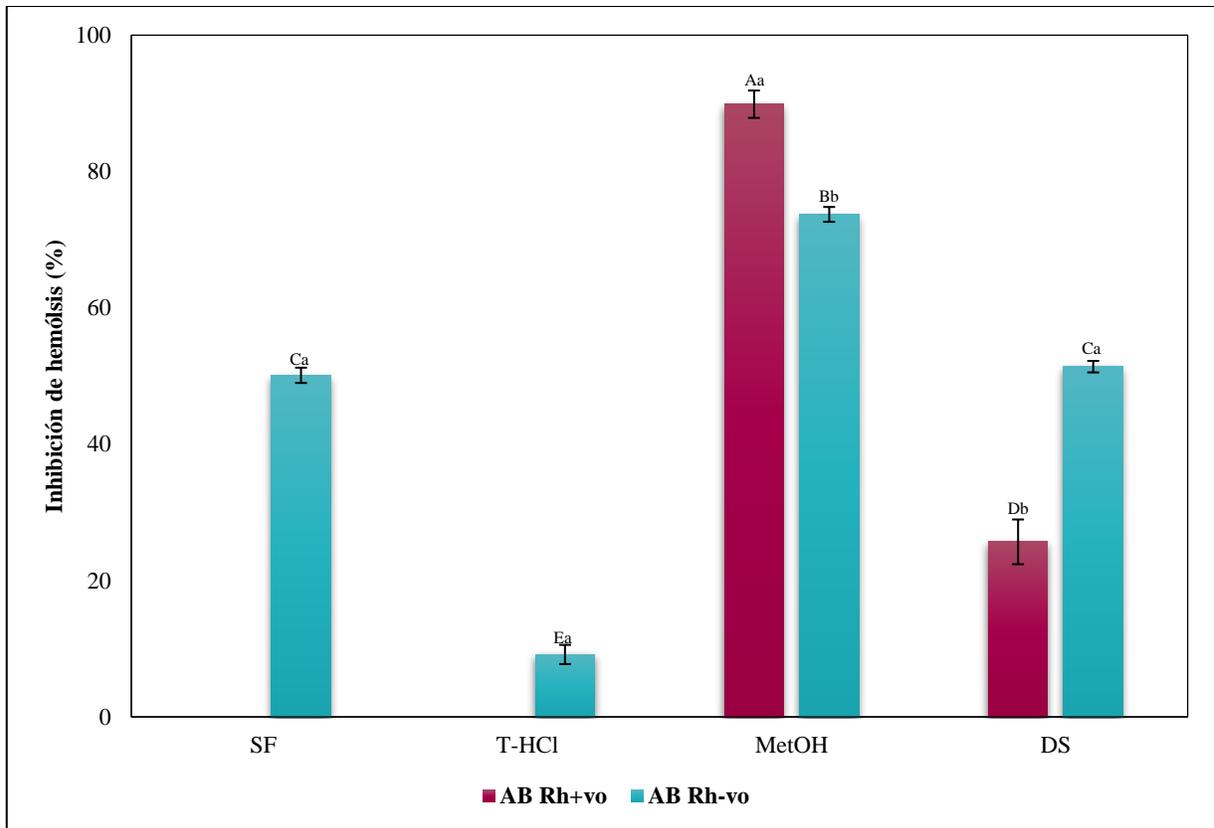


Figura 27. Efecto inhibitorio de la hemólisis inducida por calor de los extractos de *P. cruentum* sobre eritrocitos humanos con diferentes RhD (positivo y negativo) en el grupo AB. Letras distintas representan diferencias significativas de las medias entre tratamientos y grupos ($p \leq 0.001$). Letras mayúsculas representan un ANOVA bidireccional. Letras minúsculas representan un ANOVA univariante entre los extractos. Donde SF, extracto de solución fisiológica; T-HCl, extracto de Tris-HCl 0.5 M; MetOH, extracto de metanol al 99%; AA, ácido ascórbico; BCT, betacaroteno; FXA, fucoxantina.

VI. DISCUSIÓN

VI.1 Cinética de crecimiento

Diferencias en las condiciones de cultivo generan variabilidad en la cinética de crecimiento y concentraciones celulares reportadas para *P. cruentum* ($2,358,899 \pm 336,481$ cél·mL⁻¹), razón por la que los resultados concuerdan con lo reportado por Razaghi *et al.* (2014), ya que obtuvieron una concentración celular promedio de $3,220,000 \pm 280,000$ cél·mL⁻¹ en el día 8 de cultivo, el cual marcó el inicio de la fase estacionaria. Además, Arashiro *et al.* (2020) definieron el día 10 de cultivo como el punto inicial de la fase estacionaria de *P. purpureum* (2.3 g/L), dato que respalda la cinética de crecimiento esbozada en el actual proyecto.

El cultivo de *P. cruentum*, realizado en el trabajo de Razaghi *et al.* (2014), se efectuó en frascos de cultivo celular Sarstedt con un fotoperiodo de 18:6. Aunado al tamaño celular (4 a 9 µm), su comportamiento planctónico y su capacidad de formar agregados celulares (Chang *et al.*, 2015), los frascos de cultivo celular Sarstedt pueden influenciar favorablemente el incremento de la biomasa microalgal al presentar una mayor proporción área-volumen (Borics *et al.*, 2021), no obstante, se ha comprobado que un fotoperiodo constante suele ser el óptimo para la producción de biomasa microalgal (Gani *et al.*, 2021).

En ese mismo contexto, la iluminación administrada por Razaghi *et al.* (2014) (98 µmol·m⁻²·s⁻¹) fue mayor que la del propio trabajo (35 µmol·m⁻²·s⁻¹), por ende, se verificó que la cepa empleada presenta una mejor respuesta ante irradiancias menores. La información recabada experimentalmente coincide con los datos de Gudvilovich *et al.* (2021) y Arashiro *et al.* (2020), quienes registraron una mayor cantidad de biomasa y B-FE en el tratamiento de menor intensidad lumínica de la especie en *Porphyridium purpureum* (67.46 y 60 µmol·m⁻²·s⁻¹, respectivamente).

Otra cualidad asociada al cultivo es el medio F/2 (Guillard y Ryther, 1962), en el caso de Razaghi *et al.* (2014) este se modificó con una relación Redfield 24:1 (N:P), la cual es similar a la del medio F/2 original, de 24.444:1. Otras modificaciones del medio F/2 efectuadas por Razaghi *et al.* (2014) residieron en las concentraciones de fosfato de sodio, oligoelementos y

vitaminas, las cuales fueron cinco veces más altas en comparación con la fórmula original, lo que favoreció el crecimiento poblacional.

Además de las diferencias en las condiciones de cultivo, existe también una en la estimación de la concentración celular, Razaghi *et al.* (2014) la efectuaron por fluorescencia *in vivo* de clorofila, y en el presente trabajo mediante conteos manuales con una cámara Neubauer bajo el microscopio óptico. Los métodos indirectos para la determinación de la concentración celular de las microalgas son sencillos, tales como el método de fluorescencia *in vivo* de clorofila, pero su principal inconveniente es que deben ser calibrados con precisión (Tsaloglou, 2016), aparte, la baja concentración de clorofila α presente en *P. cruentum* (Durmaz *et al.*, 2017; Tran *et al.*, 2019), podría afectar la ponderación de la densidad celular de la especie utilizando ese método, por lo que los conteos tradicionales bajo el microscopio óptico podrían considerarse los mejores para la determinación de la concentración celular de *P. cruentum*.

VI.2. Cuantificación de pigmentos

La extracción de FBP está limitada por los característicos EPS de *P. cruentum* presentes en su membrana externa, que alteran la solubilidad de las FBP y dificultan la lisis celular. Por ende, en la especie *P. cruentum* es recomendable realizar la extracción y purificación de FBP al finalizar la fase exponencial, etapa con mayor concentración de células y compuestos bioactivos secundarios, y paralelamente, una menor concentración de exopolisacáridos (Jubeau *et al.*, 2012; Sreenikethanam *et al.*, 2022), con la finalidad de obtener el mejor rendimiento posible.

En el presente trabajo se logró detectar exitosamente la AFC, proceso que suele presentar dificultades por su baja concentración intracelular y su fuerte y directa unión con el fotosistema II mediante el complejo de unión núcleo-membrana (Chang *et al.*, 2015). Existen tres complejos proteicos importantes en el núcleo del ficobilisoma: la proteína enlazadora de núcleo-membrana L_{CM} (por sus siglas en inglés core-membrane linker) y dos variantes de AFC: β 18.5 y α AP-B. La L_{CM} está implicada en el ensamblaje del núcleo del ficobilisoma y las interacciones entre el núcleo y la membrana tilacoidal (de Marsac, 2005; Guan *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2015). Las proteínas L_{CM} y β 18.5 son responsables de la estrecha interacción entre el ficobilisoma y el fotosistema II, que probablemente sea necesaria para una transferencia de energía eficiente de

ficobilisoma a fotosistema II. El vínculo firme entre ficobilisoma y el fotosistema II concuerda con un informe reciente de un análisis de espectrometría de masas que demostró la formación *in vivo* del megacomplejo ficobilisoma-fotosistemas II-fotosistema I a través de entrecruzamiento de proteínas (Liu *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2015). Esto, junto con la hidrofobicidad de la L_{CM}, complica la extracción de la AFC, imposibilitando su detección en los estudios de Bermejo-Román *et al.* (2002) y Juin *et al.* (2015) para *P. cruentum* y *P. purpureum*, respectivamente. Las bajas concentraciones de clorofilas y carotenoides totales son un aspecto común en la especie, puesto que la transferencia de energía es efectuada principalmente por las FBP (Takaichi, 2011; Björling *et al.*, 2016).

Los resultados de las concentraciones de FBP fueron mayores que los de Rebollos-Fuentes *et al.* (2000) para la misma especie; lo anterior puede deberse a la extracción ya que el metanol remueve compuestos no polares, tales como las clorofilas y carotenoides, además, la implosión de las burbujas de cavitación creadas fomenta la ruptura de la membrana externa de las células y facilita la penetración de las soluciones acuosas para extraer una mayor cantidad de FBP, afines por su naturaleza hidrofílica (Xu *et al.*, 2020).

En el actual proyecto se utilizaron dos soluciones acuosas para extraer las FBP: la solución fisiológica y el búfer Tris HCl 0.5 M. La solución fisiológica comercial es una sustancia de uso hospitalario, aprobada por la FDA en su administración para el reemplazo de líquido extracelular (por deshidratación, hipovolemia, hemorragia, sepsis, entre otras), el tratamiento de alcalosis metabólica, reducción ligera de sodio, así como su uso durante en procedimientos comunes, como las transfusiones sanguíneas y hemodiálisis (Tonog y Lakhkar, 2021). El búfer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris HCl) es uno de los búferes más utilizados en bioquímica y biología molecular debido a su alta estabilidad y compatibilidad (Lee *et al.*, 2016), particularmente en estudios *in vitro* (Liu *et al.*, 2019).

La concentración de FBP fue mayor en el extracto realizado con el búfer T-HCl, esto puede ser consecuencia de su composición, de la cual derivan diferencias fisicoquímicas, como la salinidad y pH, de esencial importancia durante la extracción. La solución fisiológica consiste en 154 mmol·L⁻¹ de Na⁺ y 154 mmol·L⁻¹ de Cl⁻, y la de Tris HCl 0.5 M, 500 mmol·L⁻¹ de NH₂C(CH₂OH)₃·HCl, ambas disueltas en agua (Durst y Stapples, 1972; Liu *et al.*, 2019). Por su menor concentración iónica, el búfer T-HCl podría aumentar la fuerza iónica y solubilidad

de las FBP en el agua, evitando su precipitación y de agentes contaminantes por el efecto de *salting out* (Duong-Ly y Gabelli, 2014). Por otra parte, el bajo pH de 5.5 de la SF (Reddi, 2013) en comparación con el pH de 6.5 del T-HCl preparado, podría acarrear una atracción electrostática interna al perpetuar una carga neta positiva mediante la donación de H⁺, promoviendo la apertura proteica y la liberación del solvente, desnaturalizando a las FBP (Duong-Ly y Gabelli, 2014; Saran *et al.*, 2016), lo que conlleva a la obtención de una menor concentración neta de FBP en el extracto de SF.

VI.3. Determinación cuantitativa de proteínas

Si bien la concentración de proteínas totales del extracto de SF fue superior al de T-HCl, este último presenta una mayor concentración de ficobiliproteínas, por lo que la proporción de proteínas y ficobiliproteínas de los extractos repercute directamente en las propiedades bioactivas de ambos extractos.

VI.4. Análisis de las actividades biológicas de las ficobiliproteínas

Con base en la cuantificación de pigmentos, la actividad antioxidante del extracto metanólico podría estar influenciada por la presencia de clorofilas, carotenoides, y conforme a su polaridad, por ácidos grasos poliinsaturados, altamente insaturados y exopolisacáridos. Asimismo, la actividad antioxidante de los extractos acuosos es sustentada por la alta concentración de FBP, y tentativamente por endopolisacáridos, debido a su localización intracelular y su naturaleza hidrofílica (Butnariu, 2016; Agustini y Kusmiati, 2017).

VI.4.1. Determinación de la actividad antioxidante

Los ensayos ABTS⁺⁺, DPPH[•] y FRAP permiten estimar la capacidad antioxidante mediante distintas reacciones de óxido-reducción, las cuales se detallarán más adelante. Además, las tres técnicas ejecutadas forman parte del gremio de métodos con mayor frecuencia de análisis de actividad antioxidante de alimentos, nutrición y suplementos (Parcheta *et al.*, 2021). Es recomendable realizar al menos dos ensayos de actividad antioxidante, ya que por sus

particulares características fisicoquímicas y los mecanismos antioxidantes intervinientes (HAT y/o SET), posibilita identificar variaciones que de otra forma pasarían inadvertidas (Ozgen *et al.*, 2006), permitiendo obtener resultados plausibles para fines comparativos, con el objetivo de concretar sus mecanismos de acción. La aplicación de una diversidad de ensayos con diferentes mecanismos (SET, HAT y ensayos basados en peroxidación de lípidos) conducen a la obtención de un perfil de actividad antioxidante más preciso (Apak *et al.*, 2016). Con esa premisa, la realización de tres distintos ensayos antioxidantes califica al presente trabajo como apropiado; de hecho, la selección particular de los ensayos ABTS⁺, DPPH[•] y FRAP, se considera excelente para la evaluación de la capacidad antioxidante por su complementariedad (Kasote *et al.*, 2019).

Las diferencias entre la capacidad antioxidante de los extractos dependiendo de los métodos efectuados pueden explicarse por los mecanismos antioxidantes HAT y SET propios de cada ensayo realizado (Bibi-Sadeer *et al.*, 2020; Siddeeg *et al.*, 2021).

El ABTS es un compuesto químicamente estable y altamente soluble en agua. Actúa como sustrato, y al oxidarse con el K₂S₂O₈, produce un catión metaestable, el ABTS⁺⁺ (Ec. 10) (Kumar *et al.*, 2018b) en un tiempo de 12 a 16 h. Una vez generado, uno de los mecanismos antioxidantes involucrados es el HAT, que consiste en la donación de un átomo de hidrógeno, cuyo electrón se aparea en el último orbital de energía, lo que produce ABTS y un radical menos reactivo (Ec. 11). En el mismo ensayo el mecanismo antioxidante SET implica la donación de un electrón, que una vez apareado, produce ABTS y un radical menos reactivo (Ec. 12). La reducción del radical ABTS⁺⁺ ya sea por el mecanismo HAT o SET, genera un cambio colorimétrico de verde azul a azul claro, el cual confirma la regeneración en su forma estable, ABTS, bajo una temperatura de 30 °C hasta que se estabilice la reacción, aproximadamente en 30 min (Re *et al.*, 1999; Bibi-Sadeer *et al.*, 2020). El secuestro del radical ABTS⁺⁺ puede ser detectado por el blanqueamiento de los diferentes picos de absorción, son comúnmente utilizados el de 734 nm si el medio de reacción es el búfer sodio fosfato y 750 nm si es etanol, bajo un pH promedio de 7.4 (Re *et al.*, 1999; Ilyasov *et al.*, 2020). El ABTS es soluble en medios orgánicos y acuosos, por lo que puede ser utilizado para evaluar compuestos lipofílicos e hidrofílicos, como los carotenoides y fenoles (Bibi-Sadeer *et al.*, 2020), así como alimentos y fluidos corporales, sin embargo, es considerado un método artificial que no utiliza un sustrato para ser oxidado. Por otro lado, el ensayo ABTS⁺⁺ muestra una correlación positiva con los resultados del método

DPPH[•] y está fuertemente correlacionado con la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) de la base de datos del USDA (Mendonça *et al.*, 2022).



El ensayo DPPH[•] dispone de un radical libre notablemente estable, previniendo su dimerización en virtud de la deslocalización electrónica de la molécula en anillos aromáticos (Mendonça *et al.*, 2022). Los mecanismos antioxidantes participantes son HAT y/o SET, siendo más dominante el SET, ya que el HAT puede llevarse a cabo como una vía de reacción marginal debido a la lenta velocidad de reacción en disolventes que aceptan enlaces de hidrógeno fuertes, como el metanol y el etanol (Huang *et al.*, 2005). El radical DPPH[•] se forma al adicionar el metanol (Brandt-Willians y Berset, 1995). El mecanismo HAT radica en la donación de un átomo de hidrógeno, generando DPPH reducido y un radical menos reactivo (Ec. 13). En el mismo ensayo, el mecanismo antioxidante secundario es el SET, por lo que se dona un electrón para producir DPPH reducido y un radical menos reactivo, posteriormente, el hidrógeno protonado puede ceder su carga positiva (Ec. 14). El electrón desapareado del DPPH[•] absorbe fuertemente a 517 nm, lo que produce un color morado intenso, pero esta cambia a un amarillo suave al reducirse como DPPH. Los cromatóforos del DPPH[•] sólo se disuelven en solventes orgánicos, por lo que son lipofílicos (Bibi-Sadeer *et al.*, 2020), de manera que son compatibles con varios sistemas de solventes, incluidos etanol, acetona acuosa, metanol, etanol acuoso y benceno (Mendonça *et al.*, 2022).



El fundamento del método FRAP recae en la reducción de la tripiridiltriazina 2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), cambiando la coloración de un azul claro, donde absorbe en la región

del UV, a un azul intenso, con un cambio de absorción dentro de la región visible del espectro electromagnético, aproximadamente en 600 nm. La reacción se desarrolla en un pH ácido, de 3.6, lo que lo diferencia del ensayo de ABTS⁺, reacción incubada en un pH neutro. El único mecanismo antioxidante es el SET, que implica la donación de un electrón, pasando de TPTZ férrico a TPTZ ferroso y un radical menos reactivo (Ec. 15), detectando la capacidad de transferencia de electrones del antioxidante, pero no la de átomos de hidrógeno. Esta reacción se mide a 593 nm. No se considera un ensayo específico, ya que todas las especies químicas con un potencial de reducción menor que el del Fe⁺³ son capaces de reducir el compuesto (Benzie y Strain, 1996; Alam *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2018b; Bibi-Sadeer *et al.*, 2020). El TPTZ es usado como ligando del ión férrico en un ambiente hidrofílico, por lo que este método es sólo aplicable a antioxidantes hidrofílicos, impidiendo la evaluación de antioxidantes hidrofóbicos. El método es comúnmente aplicado para estimar la actividad antioxidante de alimentos, bebidas, extractos de plantas, aceites esenciales y fluidos biológicos (Mendonça *et al.*, 2022).



La concentración de FBP del extracto de T-HCl es superior a la del extracto de SF, delimitadas como proteínas hidrosolubles, y por tanto, incompatibles con el solvente orgánico del ensayo DPPH[•] (Kasote *et al.*, 2019; Mendonça *et al.*, 2022), aunque esta desventaja pudo haber sido desplazada por el contenido de cisteína en las FBP. La cisteína es el único aminoácido detectable por DPPH[•] (Triantis *et al.*, 2007), posiblemente fue un factor clave en la consecución de una alta actividad antioxidante del extracto de T-HCl. En relación con eso, una mayor concentración de proteínas en el extracto de SF puede repercutir en su actividad antioxidante, en caso de que estas proteínas sean hidrofílicas, podrían interactuar con las FBP, fomentando su precipitación en el medio alcohólico en el que se desarrolla el bioensayo (Marcati *et al.*, 2014; Kasote *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2021).

Además, los endopolisacáridos sulfatados representan otros presuntos compuestos bioactivos de *P. cruentum* intervinientes en la actividad antioxidante de los extractos acuosos, dado que para su extracción y purificación se precisa de una extracción orgánica preliminar, la

cual pudo ser cubierta con la extracción metanólica del presente estudio, tras una extracción ácida, como la desempeñada por la SF (pH 5.5) y en menor medida, por el de T-HCl (pH 6.5). Por consiguiente, la concentración de endopolisacáridos hidrofílicos podría ser mayor en el extracto de SF, cuyo efecto pudo pasar desapercibido por la hidrofobicidad del ensayo de DPPH[•] (Agustini y Kusmiati, 2017; Bibi-Sadeer *et al.*, 2020), aparte, si estos actúan mediante el mecanismo HAT, su efecto antioxidante tampoco pudo haber sido detectado por FRAP. En retrospectiva, la hidrofobicidad del ensayo de DPPH[•] y la restricción del mecanismo antioxidante SET en el ensayo FRAP, pudieron afectar la determinación de la actividad antioxidante de los endopolisacáridos sulfatados probablemente rezagados en el extracto de SF y T-HCl, cuyo impacto se visualiza en una menor actividad antioxidante en el ensayo FRAP en comparación del extracto MetOH.

La actividad antioxidante, significativamente mayor, desempeñada por el extracto MetOH en los ensayos de DPPH[•] y FRAP, indica que posee compuestos antioxidantes que operan por mecanismo SET, superando la hidrofobicidad del ensayo FRAP. En ese sentido, la capacidad de transferencia electrónica no representa el mecanismo antioxidante predominante de los extractos acuosos. Esto se puede constatar por los resultados del ensayo ABTS^{•+}, donde la actividad antioxidante de los extractos acuosos fue significativamente mayor que la del extracto MetOH, por lo que se puede deducir que actúan principalmente por el mecanismo antioxidante HAT.

Generalmente los ensayos basados en SET se correlacionan bien entre sí, aunque los compuestos intervinientes son distintos, la base del mecanismo de acción es similar, motivo por el cual se puede calificar redundante la aplicación de una serie de ensayos basados exclusivamente en SET (Apak *et al.*, 2016). Por lo contrario, los ensayos basados en HAT y SET, no necesariamente están correlacionados (Apak *et al.*, 2016), tal como ocurrió con todos los extractos en los ensayos ABTS^{•+} y FRAP, que funcionan bajo una polaridad y mecanismos antioxidantes distintos.

Fuertes correlaciones entre los ensayos demuestran su efectividad y complementariedad en la evaluación de la actividad antioxidante (Shahid-Ud-Daula *et al.*, 2015). En este caso, se determinó una fuerte correlación en los resultados de la actividad antioxidante de los ensayos FRAP y DPPH[•], exceptuando el extracto MetOH, lo cual puede fundamentarse por una actividad antioxidante significativamente mayor, propiciada por el prevaleciente mecanismo SET; de

igual manera, se obtuvo una fuerte correlación entre los resultados de la actividad antioxidante de los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+}, pero no en el extracto de SF, donde el mecanismo antioxidante HAT podría ser aún más predominante que en el extracto de T-HCl. Las diferencias en las concentraciones de los compuestos bioactivos del extracto de SF afectaron la correlación de los resultados de los ensayos DPPH[•] y ABTS^{•+}. Esto se le puede adjudicar a una menor concentración de FBP que actúan principalmente por HAT, una mayor concentración de otras proteínas que repercuten la disponibilidad de las FBP como antioxidantes al interactuar con ellas, y una concentración superior de endopolisacáridos hidrosolubles, los cuales pudieron promover la actividad antioxidante en el ensayo ABTS^{•+} pero no el ensayo DPPH[•], el cual presenta afinidad exclusiva con los compuestos antioxidantes hidrofóbicos. Se sugiere que los extractos acuosos efectúan ambos mecanismos antioxidantes, principalmente el HAT, cuya predominancia es aún mayor en el extracto de SF.

El mecanismo antioxidante principal de las clorofilas reside en una efectiva donación de electrones, provista por su capacidad de secuestrar radicales y su sistema de dobles enlaces conjugados. A pesar de tratarse de pigmentos comunes, no suelen incluirse en investigaciones de capacidad antioxidante (Casagrande-do-Nascimento *et al.*, 2020), elemento considerado en el presente estudio a través del extracto metanólico, el cual sobresalió como antioxidante.

Los carotenoides son pigmentos naturales liposolubles de color amarillo, naranja o rojo ($\lambda_{\text{max}} = \sim 450 \text{ nm}$) cuya estructura química simple consiste en un esqueleto lineal y simétrico con una serie de dobles enlaces conjugados. Los dobles enlaces conjugados generan un sistema de resonancia de electrones π que se mueven a lo largo de toda la cadena poliénica, lo que los hace muy reactivos (Casagrande-do-Nascimento *et al.*, 2020). Los grupos activos de los carotenoides estriban en el número de dobles enlaces conjugados, los cuales influyen en su capacidad para secuestrar ERO, en el tipo de grupos terminales estructurales, especialmente si contienen oxígeno, ya que definen la capacidad captadora de peróxido a través de los grupos hidroxilos y cetonas. Estos actúan mediante ambos mecanismos antioxidantes, primordialmente SET, donde la longitud del cromatóforo retribuye en la cantidad de electrones disponibles para su transferencia (El-Agamey *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2012; Poliak *et al.*, 2018). Los carotenoides más abundantes de *P. cruentum* son la zeaxantina y el β -caroteno (di-Lena *et al.*, 2019), la primera pertenece al grupo de las xantófilas, por lo que contiene oxígeno en algunos

sustituyentes, y el segundo forma parte de los carotenos, que consiste en cadena carbonatada simple.

La capacidad para secuestrar ERO, atribuida a los carotenos, y la del secuestro de peróxido, otorgada por las xantófilas, así como la transferencia electrónica conferida por las clorofilas, en conjunto en menor medida con el mecanismo HAT (Casagrande-do-Nascimento *et al.*, 2020), están involucradas en la actividad antioxidante del extracto MetOH, efectuada principalmente por SET, fenómeno revelado por el análisis de correlación de Pearson de los ensayos FRAP, DPPH[•] y ABTS^{•+}, de tal forma que los resultados obtenidos tienen respaldo bioquímico y estadístico.

Las propiedades redox y quelantes de metales de las ficobiliproteínas, singularmente la de sus cromóforos, se han evidenciado mediante varios ensayos de actividad antioxidante: ORAC, TRAP, β -caroteno o blanqueo de crocina, FRAP, inhibición de la peroxidación lipídica, TBARS, CUPRAC, DPPH[•], ABTS^{•+}, HORAC, entre otros (Kenny *et al.*, 2015). Las FBP inhiben radicales hidroxilo, y esta capacidad es directamente proporcional al contenido de ficobilinas, que actúan como eliminadores de ERO (Casagrande-do-Nascimento *et al.*, 2020).

Cada ficobiliproteína posee mecanismos de actividad antioxidante particulares. Se ha establecido que las FE actúan por ruta primaria, mediante el secuestro directo de ERO, presentan también un alto poder reductor, mientras que las FC y AFC realizan ambas vías, primaria y secundaria, destacando como quelantes de iones metálicos que participan en la síntesis de ERO (Sonani *et al.*, 2014; Sonani *et al.*, 2015). Los mecanismos antioxidantes dependen también de las variaciones en la distribución de aminoácidos, entre ellos destacan por su contenido de aminoácidos hidrofóbicos, considerados excelentes donadores de protones y quelantes de iones metálicos, también de aminoácidos ácidos, básicos y aromáticos, que son secuestradores de iones metálicos (Sarmadi e Ismail, 2010). En ese sentido, el alto poder reductor realizado principalmente por HAT de los extractos acuosos demostrado en los ensayos antioxidantes realizados obedece a la concentración significativamente mayor de FE en comparación a la de FC y AFC. Complementariamente, se ha comprobado que el mecanismo antioxidante HAT es dominante en soluciones acuosas, tal como la de los extractos acuosos, de igual manera, el mecanismo SET predomina en solventes orgánicos, donde se pueden crear puentes de hidrógeno

con las moléculas antioxidantes (Noipa *et al.*, 2011; Boudier *et al.*, 2012; Shahidi y Ambigaipalan, 2015; Shahidi y Zhong, 2015).

VI.4.2. Ensayo de biocompatibilidad sanguínea

La hemólisis fomentada por el extracto metanólico en los eritrocitos de diferentes grupos sanguíneos puede ser originada por el metanol, el cual es un solvente capaz de reducir la estabilidad mecánica de la célula, así como la fluidez del núcleo hidrofóbico y de la membrana cercana a la superficie, además de promover la deformabilidad de los glóbulos rojos (Sonmez *et al.*, 2013). Si bien los resultados indican que el daño hemolítico se estabiliza, para una buena preservación celular es recomendable la eliminación del metanol mediante rotoevaporación u otros métodos, con el propósito de aprovechar plenamente los compuestos bioactivos contenidos en el extracto.

El resto de los resultados con un porcentaje de inhibición de hemólisis superiores al 5% parecen estar influenciados por las interacciones específicas entre los antígenos del grupo y el extracto (SF por la presencia del antígeno B en el grupo B⁺; T-HCl y SF por la presencia del antígeno B en el grupo AB⁺) o entre el RhD y el extracto (SF por el RhD ausente sobre grupo O⁻), mientras que en el caso del MetOH, fue por la naturaleza del extracto. En ese marco, la evaluación de la acción citotóxica de los extractos microalgales sobre cada grupo sanguíneo resultó elemental.

De manera generalizada, se evidenció que los extractos acuosos y metanólico provenientes de *P. cruentum* presentan biocompatibilidad sanguínea competente, por lo que la realización de otros bioensayos encaminados a la evaluación de diferentes actividades biológicas sobre eritrocitos humanos es adecuada. En el presente trabajo, dichos ensayos *a posteriori* consistieron en la evaluación de su potencial eritroprotector.

VI.4.2.1. Evaluación del potencial eritroprotector

Los mecanismos antioxidantes de los extractos, principalmente HAT en los extractos de SF y T-HCl, y SET en el extracto MetOH, regulan el efecto eritroprotector contra los radicales generados mediante el compuesto AAPH, hipotonicidad y calor, previniendo la hemólisis oxidativa. La inhibición de la hemólisis consumada por los compuestos de *P. cruentum* de los extractos podría llevarse a cabo inclusive antes de su contacto con la membrana plasmática, mediante una interacción con las glicoproteínas y proteínas de la superficie de la membrana eritrocitaria, dependiendo del grupo del sistema Rh o ABO en este caso, lo que podría suponer la formación de un complejo protector contra la oxidación de la membrana fomentada por los radicales libres (Ruiz-Cruz *et al.*, 2022) que han sido producidos por el agente AAPH, hipotonicidad o calor. Otra hipótesis, es que los extractos podrían tener influencia sobre la membrana del eritrocito al aumentar la relación de superficie/volumen, lo que tiene como consecuencia la expansión de la membrana o el encogimiento celular, modificando la interacción con las proteínas membranales, protegiendo la célula contra la hemólisis (Truong *et al.*, 2021).

La naturaleza de los ensayos de hemólisis inducida por AAPH, hipotonicidad y calor fundamentan la diferencia entre sus resultados. El AAPH es un iniciador de radicales alcoxilo y peroxilo, puntualizados como los principales generadores de daño en la membrana de los eritrocitos, por consiguiente, los extractos proporcionaron protección ante el daño oxidativo. Por otro lado, por su ausencia de organelos los eritrocitos son considerados análogos a los lisosomas. Al someter a los eritrocitos en un medio hipotónico, responden con adaptaciones en la ósmosis y tonicidad celular, acción que definió la estabilidad del eritrocito ante cambios osmóticos, y en consecuencia, la del lisosoma, cuya estabilidad ante cambios osmóticos resulta trascendente por su alto contenido de especies reactivas y enzimas proteolíticas, importantes en las respuestas inflamatorias, y paralelamente, en la estabilidad de los eritrocitos. Asimismo, la temperatura genera cambios en el medio interno celular, incluyendo a los lisosomas, en donde se generan reacciones enzimáticas dependientes de la temperatura, por lo que pueden superar los rangos de temperatura basal, lo que permite definir su estabilidad (Goodhead y MacMillan 2017; Bourebaba *et al.*, 2020).

La susceptibilidad diferencial a daños oxidativos sobre la membrana plasmática de eritrocitos podría estar asociada a los grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD al que pertenecen, además, existen numerosos estudios de asociación entre enfermedades y grupos sanguíneos del sistema ABO y RhD. Adicionalmente, en el presente trabajo se observó que el grado en el que se manifiestan las actividades biológicas de los extractos microalgales podría depender de los antígenos de membrana. La importancia de estos fenómenos elucidada la creación de fármacos biodirigidos a un determinado grupo sanguíneo, con el fin de tratar y/o prevenir enfermedades transmisibles y no transmisibles de manera eficiente, a favor de la salud humana.

VI.4.2.2. Actividad antihemolítica en eritrocitos por el método 2,2'-azobis-(2-metilpropionamida) (AAPH)

El AAPH es un iniciador de radicales libres capaces de promover una hemólisis oxidativa mediante la peroxidación lipídica y la oxidación de las proteínas de membrana eritrocitaria. La acumulación de lípidos oxidados alrededor de la banda 3 posiblemente conlleva a la formación de agujeros en la membrana de los eritrocitos, conduciendo a la hemólisis (Ximenes *et al.*, 2010; Naparło *et al.*, 2020). Las ERO generadas por el compuesto AAPH, especialmente el H₂O₂, un metabolito celular fisiológico producido en reacciones enzimáticas y no enzimáticas, pueden desencadenar la oxidación de proteínas, como la hemoglobina, y de lípidos, particularmente el éster de colesterol, fomentando daños en la morfología celular y la estructura de la membrana y, en última instancia, a la hemólisis (Shahidi y Zhong, 2015). El HAT es considerado el mecanismo antioxidante de los ensayos basados en el compuesto AAPH (Santos-Sánchez *et al.*, 2019), lo que fundamenta la destacada capacidad antihemolítica de los extractos acuosos, que realizan primordialmente el mecanismo antioxidante HAT, mientras que en el extracto MetOH, a pesar de que el mecanismo HAT no representa su principal mecanismo antioxidante, sigue considerándose destacable, y fue efectivo al superar su actividad prohemolítica ante la presencia de radicales libres producidos por el compuesto AAPH.

Los extractos de *P. cruentum* ejercieron un efecto protector de los eritrocitos contra la hemólisis oxidativa generada por el compuesto AAPH, con resultados distintos dependiendo del sistema del grupo sanguíneo. Los extractos acuosos desempeñaron una total inhibición de la

hemólisis sobre el fenotipo A. En el grupo O también se generó una inhibición total de la hemólisis con el extracto de SF, pero con una menor eritroprotección ejercida por el extracto de T-HCl, con un efecto antihemolítico reducido en los grupos B y AB efectuado por ambos extractos acuosos. Esto podría denotar que el antígeno B, presente en los grupos B y AB, afectan el efecto eritroprotector de los extractos acuosos, y como añadidura, la posibilidad de que el antígeno A incremente su actividad antihemolítica. Ello resulta relevante, ya que el grupo A es el que presenta una mayor incidencia de COVID-19 y determinados carcinomas (Aly y Yousef, 2014; Meo *et al.*, 2017; Ellinghau *et al.*, 2020).

El extracto MetOH llevó a cabo un efecto eritroprotector absoluto en todos los grupos sanguíneos. El extracto MetOH suele ser descartado en el proceso de extracción de FBP (Lauceri *et al.*, 2017; Galetović *et al.*, 2020), pero por su potencial como agente antihemolítico puede ser considerado como subproducto.

Los resultados indican que presencia o ausencia del RhD tiene influencia en el efecto eritroprotector efectuado por los extractos, en mayor o menor medida según el grupo del sistema ABO al que pertenece. En retrospectiva, la presencia del RhD conlleva a una mejor eritroprotección en el grupo A por los extractos acuosos, en cambio, el RhD no afectó la capacidad eritroprotectora propiciada por el extracto MetOH. En el grupo O, el extracto MetOH tuvo un mejor efecto eritroprotector con la presencia del RhD, mientras el de T-HCl mostró una capacidad antihemolítica superior por la ausencia del RhD. Análogamente, los extractos acuosos tuvieron un efecto eritroprotector menor sobre el grupo AB, pero el extracto MetOH destacó por su capacidad antihemolítica equivalente al de los antioxidantes estándares, en el cual, la presencia del RhD permitió una mayor protección de la membrana del eritrocito.

Las investigaciones del efecto eritroprotector de diferentes compuestos microalgales contra la hemólisis inducida por AAPH son limitadas. Romay y González (2000) determinaron la capacidad antihemolítica de una muestra de 0.75 mM de FC, la cual fue del 97%, sin embargo, no se especificó el grupo sanguíneo del experimento. También, González-Vega *et al.* (2021) evaluaron el efecto eritroprotector de extractos provenientes de la diatomea *Navicula incerta* y obtuvieron altos porcentajes de inhibición de hemólisis con un extracto acetónico ($89.20\% \pm 0.70$), metanólico ($96.70\% \pm 1.10$) y etanólico ($81.80\% \pm 3.20$) sobre el grupo O. Con base en el mismo tipo de extracto y grupo sanguíneo, en el presente trabajo el porcentaje de inhibición

de hemólisis detectado fue superior ($100.00 \% \pm 0.41$). Por otra parte, Ruiz-Cruz *et al.* (2022) reportaron actividad antihemolítica de extractos originarios de *N. incerta* con un porcentaje de inhibición de hemólisis efectuado por el extracto metanólico para el grupo A ($68.67\% \pm 5.36$), B ($76.33\% \pm 3.51$) y O ($77.73 \% \pm 4.03$), considerando también el RhD, con un porcentaje de inhibición de hemólisis para el grupo O RhD positivo ($69.09 \% \pm 2.44$) y RhD negativo ($68.16\% \pm 3.21$), realizando una comparación, los resultados del presente estudio indican una mayor capacidad eritroprotectora del extracto MetOH para todos los grupos: A ($98.58\% \pm 1.74$), B ($100.00\% \pm 0.41$) y O ($100.00 \% \pm 0.41$). Igualmente, con los grupos O RhD positivo ($100.00 \% \pm 0.41$) y RhD negativo ($58.22\% \pm 0.80$), resultados que reflejan una mayor capacidad inhibitoria de la hemólisis en todos los grupos, exceptuando el grupo O con RhD negativo, donde la ausencia del RhD repercutió el papel inhibitorio de la hemólisis de los compuestos antioxidantes propios del extracto MetOH.

VI.4.2.3. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por hipotonicidad

La estabilidad de la membrana eritrocitaria puede ser extrapolada a la estabilización de la membrana lisosomal, por su ausencia de organelos y similitud en la membrana celular (Gunathilake *et al.*, 2018). Durante el proceso inflamatorio, leucocitos y neutrófilos liberan enzimas lisosomales hacia los sitios de inflamación (Thomas, 2017; Aidoo *et al.*, 2021), estas pueden generar una inflamación persistente y daño tisular, atentando contra la salud humana. El efecto de la vascularización durante la inflamación es reproducido por la solución hipotónica, análisis en donde la estabilización de las membranas de los glóbulos rojos representan las membranas lisosomales, cuya importancia recae en la limitación de la respuesta inflamatoria, al prevenir la liberación de enzimas lisosomales. Por lo anterior, la inducción de la hemólisis inducida por hipotonicidad es un método ampliamente utilizado en la investigación como parámetro bioquímico para las pruebas de actividad antiinflamatoria *in vitro* (Khairinisa *et al.*, 2022).

La solución hipotónica empleada en el ensayo fomenta la hemólisis debido a la acumulación excesiva de líquido en las células, suscitando daños en la membrana celular, lo que aumenta su susceptibilidad ante el daño secundario. El daño secundario hace referencia a la

peroxidación de lípidos inducidos por radicales libres (Bukhari *et al.*, 2013; Yesmin *et al.*, 2020), esto se puede prevenir mediante la estabilización de la membrana, acción posiblemente efectuada por los extractos microalgales acuosos y MetOH de *P. cruentum*.

Los resultados del ensayo de hemólisis inducida por hipotonicidad sobre los antígenos ABO tuvieron un comportamiento similar en los diferentes grupos sanguíneos, en donde se observó una mayor actividad antihemolítica efectuada por todos los extractos en el grupo O, seguido del B y finalmente en los grupos A y AB. Estos resultados sugieren que la presencia de antígenos A y B podrían afectar la inhibición de la hemólisis ante cambios osmóticos de los extractos. Existe una probable asociación del RhD y la protección de los extractos contra la hemólisis inducida por hipotonicidad, ya que se observó que ante la ausencia del RhD los extractos microalgales y el DS protegieron mejor la membrana celular, exceptuando el extracto MetOH en el grupo A y el de T-HCl en el O.

El-Shafay *et al.* (2021) determinaron la capacidad inhibitoria de hemólisis inducida por hipotonicidad de extractos microalgales provenientes de diferentes especies, si bien no se especificó el grupo sanguíneo, las comparaciones se realizaron con el grupo O⁺ por su frecuencia poblacional. Obtuvieron altos porcentajes de inhibición de la hemólisis, provenientes de un extracto metanólico de *Padina pavonica* (77.20±0.24), metanólico de *Jania rubens* (79.08±0.02), etanólico de *Taonia atomaria* (57.50 ±0.23) y metanólico de *Corallina elongata* (66.70±0.05), los cuales, en contraste con los resultados de los extractos de *P. cruentum* de T-HCl (100.00±3.46) y MetOH (87.30±4.07), fueron mayores, exceptuando el de SF (74.87±9.13), esto puede ser explicado por una menor concentración de B-FE, R-FC y de FBP neta en comparación con el extracto de T-HCl, los cuales representan su principal compuesto bioactivo contenido.

VI.4.2.4. Ensayo de inhibición de hemólisis inducida por calor

La inflamación fomenta la lisis de los glóbulos rojos, lo que provoca una pérdida de actividad celular y liberación de componentes intracelulares. Además, mediadores inflamatorios, como las citoquinas, aumentan la permeabilidad de la membrana, aumentando su vulnerabilidad ante

el daño oxidativo. La inhibición de la desestabilización de la membrana de glóbulos rojos por el calor justifica sus propiedades antiinflamatorias (Bliss *et al.*, 2022).

El extracto MetOH sobresalió por su alta capacidad inhibitoria de la hemólisis inducida por calor sobre los antígenos ABO, de hecho, fueron superiores a la del DS, aunque los extractos acuosos proporcionaron también una menor capacidad inhibitoria de la hemólisis. En el caso del grupo O, la presencia del RhD potenció el efecto antihemolítico de los extractos microalgales, mientras que en el grupo A ocurrió lo contrario, excepto con el extracto de SF. Aparentemente, la presencia del RhD en el grupo AB anuló la capacidad inhibitoria de hemólisis de los extractos acuosos, pero no la del extracto MetOH, superando inclusive a la protección proporcionada al grupo AB⁻.

Pradhan *et al.* (2021) realizaron un estudio en el que evaluaron la capacidad eritroprotectora de extractos del alga verde *Enteromorpha intestinalis* a través de una hemólisis inducida por calor. Determinaron los porcentajes de inhibición de hemólisis de un extracto metanólico (10.81±01.12), etanólico (11.21±01.76) y hexanoico (13.09±01.98), estos, en contraste con los de *P. cruentum* del presente estudio sobre el grupo O: SF (25.08±03.14), T-HCl (100.00±3.46) MetOH (87.30±4.07), fueron menores. Las diferencias son atribuidas a las características particulares de cada extracto, como la especie de origen, el medio y los compuestos, por lo que los extractos microalgales de *P. cruentum* demostraron ser excelentes candidatos antiinflamatorios y antihemolíticos.

VII. CONCLUSIONES

La extracción asistida por ultrasonido fomenta la ruptura de la membrana externa de *P. cruentum*, lo que permite una mejor extracción de ficobiliproteínas. La capacidad antioxidante de las ficoiliproteínas está sustentada por su potencial antirradicalario (ABTS⁺⁺ y DPPH[•]) y potencial reductor (FRAP), por lo que actúan mediante los mecanismos antioxidantes HAT y SET. Los mecanismos antioxidantes de los extractos, principalmente HAT en los extractos de SF y T-HCl, y SET en el extracto MetOH, regulan el efecto eritroprotector contra los radicales generados mediante el compuesto AAPH, hipotonicidad y calor, previniendo la hemólisis oxidativa. Los resultados de los análisis de la evaluación del efecto eritroprotector de los extractos de *P. cruentum* revelaron una probable relación entre los diferentes antígenos (ABO y RhD) con el efecto antihemolítico. La importancia de estos fenómenos elucidó la creación de fármacos biodirigidos a un determinado grupo sanguíneo, con el fin de tratar y/o prevenir enfermedades transmisibles y no transmisibles de manera eficiente, a favor de la salud humana.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar un método dirigido a la ruptura de la membrana externa *de P. cruentum*, la cual es alta en polisacáridos sulfatados, y posteriormente realizar el método de extracción asistida con ultrasonido.

Es conveniente la realización de un perfil electroforético SDS-PAGE con el fin de detectar cualitativamente a las FBP.

IX. LITERATURA CITADA

- Abdal-Dayem, A., M. Hossain, S. Lee, K. Kim, S. Saha, G. Yang, H. Choi y G. Yang. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (1). doi:10.3390/ijms18010120.
- Abegaz, S. B. 2021. Human ABO Blood Groups and Their Associations with Different Diseases. *Biomed Res Int.* 6629060. doi: 10.1155/2021/6629060.
- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J., Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A., Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel y M. F. Taylor. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5). doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x.
- Agarwal, H. y V. K. Shanmugam. 2019. Anti-inflammatory activity screening of *Kalanchoe pinnata* methanol extract T and its validation using a computational simulation approach. *Inform Med Unlocked* 14: 6–14 p. doi:10.1016/j.imu.2019.01.002.
- Agustini, N. y W. S. Kusmiati. 2017. Potency of Endo-Exopolysaccharide from *Porphyridium cruentum* (S.F.Gray) Nägeli as Antioxidant (DPPH) y Biological Toxicity (BSLT). *KnE Life Sciences* 3 (4). doi:10.18502/cls.v3i4.699.
- Aidoo, D. B., D. Konja, I. T. Henneh y M Ekor. 2021. Protective Effect of Bergapten against Human Erythrocyte Hemolysis and Protein Denaturation In Vitro. *International journal of inflammation* 1279359. doi:10.1155/2021/1279359.
- Al-Sawat, A., S. Alswat, R. Alosaimi, M. Alharthi, M. Alsuwat, K. Alhasani y W. Alharthi. 2022. Relationship Between ABO Blood Group and the Risk of Colorectal Cancer: A Retrospective Multicenter Study. *Journal of Clinical Medicine Research, North America* 14 (3): 119–125 p. doi:10.14740/jocmr4691.
- Alam, M. A., J. L. Xu y Z. Wang. 2020. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. Springer Singapore. doi:10.1007/978-981-15-0169-2.
- Alamgir, A. N. M. 2018. *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2* 74 (1). Springer International Publishing, Berlín, Alemania. doi:10.1007/978-3-319-92387-1.
- Alayash, A. I., R. P. Patel y R. E. Cashon. 2001. Redox Reactions of Hemoglobin y Myoglobin: Biological y Toxicological Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 3 (2). doi:10.1089/152308601300185250.
- Aly, R. y A. Yousef. 2014. Association of ABO Blood Group y Risk of Breast Cancer. *Journal of Blood Disorders & Transfusion* 5 (2). doi:10.4172/2155-9864.1000241.
- Amarowicz, R. y R. B. Pegg. 2019. Natural antioxidants of plant origin. *Advances in food and nutrition research* 90: 1–81 p. doi:10.1016/bs.afnr.2019.02.011.
- Amendola, R., M. Cervelli, G. Tempera, E. Fratini, L. Varesio, P. Mariottini y E. Agostinelli. 2014. Spermine metabolism y radiation-derived reactive oxygen species for future

- therapeutic implications in cancer: an additive or adaptive response. *Amino Acids* 46 (3). doi:10.1007/s00726-013-1579-9
- Anderson, J. L., H. T. May, S. Knight, T. L. Bair, B. D. Horne y K. U. Knowlton. 2022. Association of Rhesus factor blood type with risk of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity. *Br J Haematol* 197: 573-575 p. doi:10.1111/bjh.18086.
- Anwer, K., R. Sonani, D. Madamwar, P. Singh, F. Khan, K. Bisetty, F. Ahmad y M. I. Hassan. 2015. Role of N-terminal residues on folding y stability of C-phycoerythrin: simulation y urea-induced denaturation studies. *Journal of Biomolecular Structure y Dynamics* 33 (1). doi:10.1080/07391102.2013.855144.
- Apak, R., Özyürek M., K. Güçlü y E. Çapanoğlu. 2016. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1. Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, y Electron Transfer (ET)-Based Assays. *Journal of Agricultural y Food Chemistry* 64 (5). doi: 10.1021/acs.jafc.5b04739.
- Apt, K. E., Collier J. L. y A. R. Grossman. 1995. Evolution of the Phycobiliproteins. *Journal of Molecular Biology* 248 (1). doi:10.1006/jmbi.1995.0203.
- Arashiro, L., M. Boto-Ordóñez, S. Van Hulle, I. Ferrer, Iveta, A. Garfí y D. Rousseau. 2020. Natural pigments from microalgae grown in industrial wastewater. *Bioresource Technology* 303 122894. doi:10.1016/j.biortech.2020.122894.
- Ardiles, P., P. Cerezal-Mezquita, F. Salinas-Fuentes, D. Órdenes, G. Renato y M. C. Ruiz-Domínguez. 2020. Biochemical Composition y Phycoerythrin Extraction from Red Microalgae: A Comparative Study Using Green Extraction Technologies. *Processes* 8 (12). doi:10.3390/pr8121628.
- Arredondo-Vega, B. O. y D. Voltolina. 2007. MÉTODOS Y HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EN LA EVALUACIÓN DE LA BIOMASA MICROALGAL. CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DEL NOROESTE, S. C.
- Arteni, A. A., L. N. Liu, T. J. Aartsma, Y. Z. Zhang, B. C. Zhou y E. J. Boekema. 2008. Structure y organization of phycobilisomes on membranes of the red alga *Porphyridium cruentum*. *Photosynthesis Research* 95 (2–3). doi:10.1007/s11120-007-9264-z.
- Barodka, V. M., E. Nagababu, J. G. Mohanty, D. Nyhan, D. E. Berkowitz, J. M. Rifkind, J. J. Strouse. 2014. New insights provided by a comparison of impaired deformability with erythrocyte oxidative stress for sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, y Diseases* 52 (4). doi:10.1016/j.bcmd.2013.10.004.
- Beer, S. y A. Eshel. 1985. Determining phycoerythrin y phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Marine y Freshwater Research* 36 (6). doi:10.1071/MF9850785.
- Belokoneva, O. S., E. Villegas, G. Corzo, L. Dai y T. Nakajima. 2003. The hemolytic activity of six arachnid cationic peptides is affected by the phosphatidylcholine-to-sphingomyelin ratio in lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1617 (1–2). doi:10.1016/j.bbamem.2003.08.010.
- Benavente-Valdés, J. R., C. Aguilar, J. C. Contreras-Esquivel, A. Méndez-Zavala y J. Montañez. 2016. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments y lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports* 10. doi:10.1016/j.btre.2016.04.001.

- Bennett, A. y L. Bogorad. 1973. COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. *Journal of Cell Biology* 58 (2). doi:10.1083/jcb.58.2.419.
- Benzie, I. and J. Strain, 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239, 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.
- Berendes, H. R., R. A. Bridges y R. A. Good. 1957. A Fatal Granulomatosis of Childhood. *Minn. Med.* 40: 309.
- Bermejo-Román, R., J. M. Alvarez-Pez, F. G. Acién-Fernández y E. Molina-Grima. 2002. Recovery of pure B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Biotechnology* 93 (1). doi:10.1016/S0168-1656(01)00385-6.
- Bermejo-Román, R., Talavera, E. M. y J. M. Alvarez-Pez. 2001. Chromatographic purification y characterization of B-phycoerythrin from *Porphyridium cruentum*. *Journal of Chromatography A* 917: 1–2 p. doi:10.1016/S0021-9673(01)00692-6.
- Bibi-Sadeer, N., D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin y M. F. Mahomoodally. 2020. The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations. *Antioxidants* 9 (8). doi:10.3390/antiox9080709.
- Biswas, A., Y. Jiang, D. Li, H. J. Mehta y F. Kaye. 2018. The Prevalence of Rhesus-Negative Blood Group Among Patient With Small Cell Lung Cancer and Analysis of Its Effect on Overall Survival. *Front. Oncol.* 8: 358. doi: 10.3389/fonc.2018.00358
- Björling, A., O. Berntsson, H. Lehtivuori, H. Takala, A. J. Hughes, M. Panman, M. Hoernke, S. Niebling, L. Henry, R. Henning, I. Kosheleva, V. Chukharev, N. K. Tkachenko, A. Menzel, G. Newby, D. Khakhulin, M. Wulff, J. A. Ihalainen y S. Westenhoff. 2016. Structural photoactivation of a full-length bacterial phytochrome. *Science Advances* 2 (8). doi:10.1126/sciadv.1600920.
- Bliss, O., E. Ejiofor, C. Njoku, Chigozie Njoku, M. Ejiofor y K. Michael. 2022. C-MS Characterization, in vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Essential Oil from the Leaves of *Stachytarpheta jamaicensis*. *J. Mex. Chem. Soc.* 66 (4). doi:10.29356/jmcs.v66i4.1822.
- Borics, G., V. Lerf, E. T-Krasznai, I. Stanković, L. Pickó, V. Béres y G. Várbíró. 2021. Biovolume y surface area calculations for microalgae, using realistic 3D models. *Science of The Total Environment* 773. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145538.
- Borowitzka, M. A. 2018. Biology of Microalgae. In *Microalgae in Health y Disease Prevention*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7.
- Boudier, A., J. Tournèze, G. Bartosz, S. El-Hani, R. Bengueddour, A. Sapin-Minet y P. Leroy. 2012. High performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants. *Anal. Chim. Acta* 20 (711): 97–106 p. doi:10.1016/j.aca.2011.10.063.
- Bourebaba, B., B. Gilbert-López, N. Oukil y F. Bedjou. 2020. Phytochemical composition of *Ecballium elaterium* extracts with antioxidant and anti-inflammatory activities: Comparison among leaves, flowers and fruits extracts. *Arabian Journal of Chemistry* 13 (1): 3286-3300 p. doi:10.1016/j.arabjc.2018.11.004.

- Bozza, M. T. y V. Jeney. 2020. Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs. *Frontiers in immunology* 11: 1323. doi:10.3389/fimmu.2020.01323.
- Brainina, K., N. Stozhko y M. Vidrevich. 2019. Antioxidants: Terminology, Methods, y Future Considerations. *Antioxidants* 8 (8). doi:10.3390/antiox8080297.
- Brand-Williams, W., M. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25–30 p. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5.
- Bryant, D. A., G. Guglielmi, N. T. de Marsac, A. M. Castets y G. Cohen-Bazire. 1979. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology* 123 (2). doi:10.1007/BF00446810.
- Bukhari, I. A., M. S. Alhumayyd, A. L. Mahesar y A. H. Gilani. 2013. The analgesic and anticonvulsant effects of piperine in mice. *J Physiol Pharmacol.* 64: 789.
- Butnariu, M. 2016. Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products. *Journal of Ecosystem & Ecography.* 6. doi:10.4172/2157-7625.1000193.
- Cadamuro, J., C. Mrazek, E. Haschke-Becher y S. Sandberg. 2017. To report or not to report: a proposal on how to deal with altered test results in hemolytic samples. *Clinical Chemistry y Laboratory Medicine (CCLM)* 55 (8). doi:10.1515/cclm-2016-1064.
- Canizalez-Román, A., A. Campos-Romero, J. A. Castro-Sánchez, M. A. López-Martínez, F. J. Andrade-Muñoz, C. K. Cruz-Zamudio, T. G. Ortíz-Espinoza, N. León-Sicairos, A. M. Gaudrón-Llanos, J. Velázquez-Román, H. Flores-Villaseñor, S. Muro-Amador, J. J. Martínez-García y J. Alcántar-Fernández. 2018. Blood Groups Distribution and Gene Diversity of the ABO and Rh (D) Loci in the Mexican Population. *BioMed research international* 1925619. doi:10.1155/2018/1925619.
- Canton, J. 2014. Phagosome maturation in polarized macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 96 (5). doi:10.1189/jlb.1MR0114-021R.
- Carvajal-Carvajal, C. 2019. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica* 36 (1): 91–100.
- Casagrande-do-Nascimento, T., R. Campos-Chisté y L. Queiroz-Zepka. 2020. Analytical Protocols in Antioxidant Capacity Measurement. En: E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz y L. Queiroz-Zepka (Eds). 203-228 p. *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature Switzerland. doi:10.1007/978-3-030-50971-2_9.
- Ceballos, G., E. Meaney, M. Ortiz-Flores y N. Nájera. 2021. Radicales libres, estrés oxidativo y la caja de Pandora. *Cardiovasc Metab Sci* 32 (3):164-167 p. doi:10.35366/100790.
- Chang, L., X. Liu, Y. Li, F. Yang, J. Zhao y S. F. Sui. 2015. Structural organization of an intact phycobilisome y its association with photosystem II. *Cell Research* 25 (6). doi:10.1038/cr.2015.59.
- Chapman, R. L. 2013. Algae: the world’s most important “plants”—an introduction. *Mitigation y Adaptation Strategies for Global Change* 18 (1). doi:10.1007/s11027-010-9255-9.
- Chen, Y., N. Hu, L. Liao, K. Yu, X.-O. Shu, W. Zheng, J.-M. Yuan, W.-P. Kohn, Y.-L. Qiao, S. M. Dawsey, N. D. Freedman, P. R. Taylor, A. M. Goldstein y C. C. Abnet. 2021. ABO genotypes and the risk of esophageal and gastric cancers. *BMC Cancer* 21: 589. doi:10.1186/s12885-021-08334-1.

- Chen, Y., Z. Zhou y W. Min. 2018. Mitochondria, Oxidative Stress and Innate Immunity. *Frontiers in physiology* 9: 1487. doi:10.3389/fphys.2018.01487.
- Chiong, T., C. Acquah, S. Y. Lau, E. H. Khor y M. K. Danquah. 2016. Microalgal-Based Protein By-Products: Extraction, Purification, and Applications. 213-234 p. En: Dhillon, G. S. *Protein Byproducts: Transformation from Environmental Burden Into Value-Added Products*. Elsevier Academic Press, Londres, Inglaterra. doi:10.1016/B978-0-12-802391-4.00012-4.
- Chisté, R. C., M. Freitas, A. Z. Mercadante y E. Fernandes. 2014. Carotenoids are Effective Inhibitors of *in vitro* Hemolysis of Human Erythrocytes, as Determined by a Practical y Optimized Cellular Antioxidant Assay. *Journal of Food Science* 79 (9). doi:10.1111/1750-3841.12580.
- Chisti, Y. 2018. Society y Microalgae. In *Microalgae in Health y Disease Prevention*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-811405-6.00002-5.
- Cortese-Krott, M. M. y S. Shiva. 2019. The redox physiology of red blood cells y platelets: implications for their interactions y potential use as systemic biomarkers. *Current Opinion in Physiology* 9. doi:10.1016/j.cophys.2019.04.016.
- Cortese-Krott, M. M., A. Koning, G. C. G. Kuhnle, P. Nagy., C. L. Bianco, A. Pasch, D. A. Wink, J. M. Fukuto, A. A. Jackson, H. van Goor, K. R. Olson y M. Feelisch. 2017. The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, y Opportunities for Redox Metabolomics y Personalized Medicine. *Antioxidants & Redox Signaling* 27 (10). doi:10.1089/ars.2017.7083.
- Cuéllar-Cruz, M. 2021. The histo-blood group antigens of the host cell may determine the binding of different viruses such as SARS-CoV-2. *Future Microbiology* 16 (2). doi:10.2217/fmb-2020-0158.
- Dahlén, T., M. Clements, J. Zhao, M. L. Olsson y G. Edgren. 2021. An agnostic study of associations between ABO and RhD blood group and phenome-wide disease risk *eLife* 10:e65658 doi:10.7554/eLife.65658
- Daniels, G. 2013. ABO, H, and Lewis systems. En Daniels, G., *Human Blood Groups*. Wiley-Blackwell, West Sussex. doi:10.1002/9781118493595.ch2.
- de Jesus-Raposo, M. F., R. M. Santos-Costa de Morais, A. M. Miranda-Bernardo. 2013. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences* 93 (15). doi:10.1016/j.lfs.2013.08.002.
- de Marsac, N.T. 2005. Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. En: Govindjee, J. T. Beatty, H. Gest y J. F. Allen (Eds). 193-205 p. *Discoveries in Photosynthesis. Advances in Photosynthesis and Respiration* 20. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/1-4020-3324-9_43.
- de-Mattos, L. C. 2016. Structural diversity and biological importance of ABO, H, Lewis and secretor histo-blood group carbohydrates. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia* 38 (4): 331–340 p. doi:10.1016/j.bjhh.2016.07.005
- di-Lena, G., I. Casini, M. Lucarini y G. Lombardi-Boccia. 2019. Carotenoid profiling of five microalgae species from large-scale production. *Food Research International* 120. doi:10.1016/j.foodres.2018.11.043.

- di-Lena, G., I. Casini, M. Lucarini, J. Sánchez-del Pulgar, A. Aguzzi, R. Caproni, P. Gabrielli y G. Lombardi-Boccia. 2020. Chemical characterization and nutritional evaluation of microalgal biomass from large-scale production: a comparative study of five species. *European Food Research and Technology* 246 (2). doi: 10.1007/s00217-019-03346-5.
- Duong-Ly, K. C. and S. B. Gabelli. 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods Enzymol.* 541: 85-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420119-4.00007-0.
- Durmaz, Y., F. Tamtürk, N. Konar, Ö. S. Tokey e İ. Palabiyik. 2017. Effect of Pigment Composition of *Porphyridium cruentum* as Continuously Culture Method in Industrial Scale Tubular Photobioreactor. *International Journal of Life Sciences Biotechnology y Pharma Research* 6 (1): 18–21. doi:10.18178/ijlbpr.6.1.18-21.
- Durmaz, Y., M. Monteiro, N. Bandarra, Ş. Gökpinar y O. Işık. 2007. The effect of low temperature on fatty acid composition y tocopherols of the red microalga, *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology* 19 (3). doi:10.1007/s10811-006-9127-6.
- Durst, R. A. and B. R. Staples. 1972. Tris/Tris·HCl: A Standard Buffer for Use in the Physiologic pH Range. *Clinical Chemistry* 18 (3). doi: 10.1093/clinchem/18.3.206.
- Duvigneau, J. C., H. Esterbauer y A. V. Kozlov. 2019. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants* 8 (10). doi:10.3390/antiox8100475.
- Ejike, C., S. A. Collins, N. Balasuriya, A. K. Swanson, B. Mason y C. C. Udenigwe. 2017. Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. *Trends in Food Science & Technology* 59: 30–36. doi:10.1016/j.tifs.2016.10.026.
- El-Jellas, K., D. Hoem, K. G. Hagen, M. B. Kalvenes, S. Aziz, S. J. Steine, H. Immervoll, S. Johansson y A. Molven. 2017. Associations between ABO blood groups and pancreatic ductal adenocarcinoma: influence on resection status and survival. *Cancer Med.* 2017 Jul;6(7):1531-1540. doi:10.1002/cam4.1097.
- El-Shafay, S., M. El-Sheekh, E. Bases y R. El-Shenody. 2021. Antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and anticancer potential of some seaweed extracts. *Food Science and Technology.* 42. doi:10.1590/fst.20521.
- Ellinghaus, D., F. Degenhardt, L. Bujanda, M. Buti, A. Albillos, P. Invernizzi, J. Fernández, D. Prati, J. Martín, J. Erdmann, J. Ferrusquía-Acosta, K. Garcia-Etxebarria, L. Izquierdo-Sánchez, L. R. Bettini, L. Sumoy, L. Terranova, L. Moreira, L. Santoro, J. R. Hov, T. Folseraas, L. Valenti, A. Franke y T. H. Karlsen. 2020. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. *New England Journal of Medicine* 383: 1522- 1534. doi: 10.1056/NEJMoa2020283.
- Eriksen, N. T. 2008. Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods y medicine. *Applied Microbiology y Biotechnology* 80 (1). doi:10.1007/s00253-008-1542-y.
- Farag, M. R. y M. Alagawany. 2018. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 279 (1). doi:10.1016/j.cbi.2017.11.007.
- Feller, R., Â. P. Matos, E. H. S. Moecke, R. M. Carvalho, R. G. Lopes, C. P. A. Camargo, E. S. Sant'Anna, R. B. Derner, J. V. Oliveira y A. Furigo. 2015. Comparative study of

- biochemical composition of five microalgae for biodiesel/bioproduction application. Ponencia presentada en *Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, São Paulo. Editora Edgard Blücher. doi:10.5151/chemeng-cobeq2014-1078-21191-148982.
- Feller, R., Â. P. Matos, S. Mazzutti, E. H. S. Moecke, R. B. Derner, J. V. Oliveira y A. F. Junior. 2018. Polyunsaturated ω -3 y ω -6 fatty acids, total carotenoids y antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ y subcritical n-butane. *The Journal of Supercritical Fluids* 133. doi:10.1016/j.supflu.2017.11.015.
- Fibach, E. 2021. The Redox Balance y Membrane Shedding in RBC Production, Maturation, y Senescence. *Frontiers in Physiology* 12. doi:10.3389/fphys.2021.604738.
- Fibach, E. y M. Dana. 2019. Red Blood Cells as Redox Modulators in Hemolytic Anemia. In *Erythrocyte*. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.84498.
- Forcados, G. E., A. Muhammad, O. O. Oladipo, S. Makama y C. A. Meseko. 2021. Metabolic Implications of Oxidative Stress y Inflammatory Process in SARS-CoV-2 Pathogenesis: Therapeutic Potential of Natural Antioxidants. *Frontiers in Cellular y Infection Microbiology* 11. doi:10.3389/fcimb.2021.654813.
- Gaignard, C., N. Gargouch, P. Dubessay, C. Delattre, G. Pierre, C. Laroche, I. Fendri, S. Abdelkafi y P. Michaud. 2019. New horizons in culture y valorization of red microalgae. *Biotechnology Advances* 37 (1). doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.014.
- Galetović, A., F. Seura, V. Gallardo, R. Graves, J. Cortés, C. Valdivia, J. Núñez, C. Tapia, I. Neira, S. Sanzana y B. Gómez-Silva. 2020. Use of Phycobiliproteins from Atacama Cyanobacteria as Food Colorants in a Dairy Beverage Prototype. *Foods* 9 (2): 244. doi:10.3390/foods9020244
- Gallego, R., M. Martínez, A. Cifuentes, E. Ibáñez y M. Herrero. 2019. Development of a Green Downstream Process for the Valorization of *Porphyridium cruentum* Biomass. *Molecules* 24 (8). doi:10.3390/molecules24081564.
- Gani, P., A. Hua, S. Mohamed, N. Peralta, M. Hazel y N. Apandi. 2021. The influence of photoperiod, light intensity, temperature and salinity on the growth rate and biomass productivity of *Botryococcus* sp. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 646: 012006. doi:10.1088/1755-1315/646/1/012006.
- Getawa, S., B. Bayleyegn, M. Aynalem, Y. B. Worku y T. Adane. 2022. Relationships of ABO and Rhesus blood groups with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Journal of International Medical Research* 50 (10). doi:10.1177/03000605221129547.
- Glennon-Alty, L., A. P. Hackett, E. A. Chapman y H. L. Wright. 2018. Neutrophils and redox stress in the pathogenesis of autoimmune disease. *Free radical biology & medicine* 125: 25–35 p. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.049.
- Golassa, L., A. Tsegaye, B. Erko y H. Mamo. 2017. High rhesus (Rh(D)) negative frequency and ethnic-group based ABO blood group distribution in Ethiopia. *BMC Res Notes* 10: 330. doi:10.1186/s13104-017-2644-3.
- González-Vega, R. I., J. L. Cárdenas-López, J. A. López-Elías, S. Ruiz-Cruz, A. Reyes-Díaz, L. M. Perez-Perez, F. J. Cinco-Moroyoqui, R. E. Robles-Zepeda y J. Borboa-Flores. 2021. Optimization of growing conditions for pigments production from microalga *Navicula*

- incerta* using response surface methodology y its antioxidant capacity. Saudi Journal of Biological Sciences 28 (2). doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.076.
- Goodhead, L. K. y F. M. MacMillan. 2017. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. Advances in physiology education 41 (2): 298–305 p. doi:10.1152/advan.00083.2016.
- Grossman, A. R., M. R. Schaefer, G. G. Chiang y J. L. Collier. 1993. Environmental effects on the light-harvesting complex of cyanobacteria. Journal of Bacteriology 175 (3). doi:10.1128/JB.175.3.575-582.1993.
- Guan, X., S. Qin, Z. Fangqing, Z. Xiaowen y X. Tang. 2007. Phycobilisomes linker family in cyanobacterial genomes: divergence y evolution. International Journal of Biological Sciences. doi:10.7150/ijbs.3.434.
- Gudvilovich, I., A. Lelekov, Y. Maltsev, M. Kulikovskiy y A. Borovkov. 2021. Growth of *Porphyridium purpureum* (Porphyridiales, Rhodophyta) and Production of B-Phycocerythrin under Varying Illumination. Russian Journal of Plant Physiology 68: 188-196 p. doi:10.1134S1021443720060059.
- Guillard, R. R. L. y J. H. Ryther. 1962. STUDIES OF MARINE PLANKTONIC DIATOMS: I. CYCLOTILLA NANA HUSTEDT, Y DETONULA CONFERVACEA (CLEVE) GRAN. Canadian Journal of Microbiology 8 (2). doi:10.1139/m62-029.
- Guiry, M. D. y G. M. Guiry. 2019. Algae Base: World–Wide Electronic Publication National University of Ireland. www.algabase.org (14 de February, 2021).
- Guiry, M. D. y G. M. Guiry. 2021. Porphyridium Nägeli, 1849 . AlgaBase.
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., Rupasinghe, H. P. V. 2018. In Vitro Anti-Inflammatory Properties of Selected Green Leafy Vegetables. Biomedicines 6 (4): 107. doi:10.3390/biomedicines6040107.
- Harmening, D. M. 2012. Modern Blood Banking and Transfusion Practices. Sixth Edition. Davis Company. España.
- He, L., T. He, S. Farrar, L. Ji, T. Liu y X. Ma. 2017. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. Cellular Physiology y Biochemistry 44 (2). doi:10.1159/000485089.
- He, L., V. R. Subramanian y Y. J. Tang. 2012. Experimental analysis and model-based optimization of microalgae growth in photo-bioreactors using flue gas. Biomass and Bioenergy 41 (1). doi: 10.1016/j.biombioe.2012.02.025.
- Henriksen, E. J. 2019. Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Insulin Resistance y Type 2 Diabetes. In Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-813822-9.00001-1.
- Hentati, F., L. Tounsi, D. Djomdi, G. Pierre, C. Delattre, A. V. Ursu, I. Fendri, S. Abdelkafi y P. Michaud. 2020. Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. Molecules 25 (14). doi:10.3390/molecules25143152.
- Hernández-Ruiz, K. L., S. Ruiz-Cruz, L. A. Cira-Chávez, L. E. Gassos-Ortega, J. d. J. Ornelas-Paz, C. L. Del-Toro-Sánchez, E. Márquez-Ríos, M. A. López-Mata, F. Rodríguez-Félix. 2018. Evaluation of Antioxidant Capacity, Protective Effect on Human Erythrocytes y Phenolic Compound Identification in Two Varieties of Plum Fruit (*Spondias* spp.) by UPLC-MS. Molecules 23 (12). doi:10.3390/molecules23123200.

- Huang, H.-S., W.-C. Chen, Y.-H. Gao, G.-W. Chen, H.-T. V. Lin. y C.-L. Pan. 2018. Enzyme-Assisted Method for Phycobiliproteins Extraction from *Porphyra* and Evaluation of Their Bioactivity. *Processes* 9 (3). doi:10.3390/pr9030560.
- Huang, J. B. Chen y S. Liang. 2005. Analysis of the nutritional composition in *Porphyridium cruentum*. *Food Ferm Ind* 31: 105–06.
- Ilyasov, I. R., V. L. Beloborodov, I. A. Selivanova y R. P. Terekhov. 2020. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *International journal of molecular sciences* 21 (3): 1131. doi:10.3390/ijms21031131.
- Ingle, E. 2020. Erythrocytes. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.11627-7.
- Ivanov, A. V., B. Bartosch y M. G. Isagulians. 2017. Oxidative Stress in Infection y Consequent Disease. *Oxidative Medicine y Cellular Longevity* 2017. doi:10.1155/2017/3496043.
- Jadhav, K., S. Deore, D. Dhamecha, H. R. Rajeshwari, S. Jagwani, S. Jalalpure y R. Bohara. 2018. Phytosynthesis of Silver Nanoparticles: Characterization, Biocompatibility Studies, and Anticancer Activity. *ACS biomaterials science & engineering* 4 (3): 892–899 p. doi:10.1021/acsbomaterials.7b00707.
- Jubeau, S., L. Marchal, J. Pruvost, P. Jaouen, J. Legrand y J. Fleurence. 2012. High pressure disruption: a two-step treatment for selective extraction of intracellular components from the microalga *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology* 25: 983-989 p.
- Juin, C., J. R. Chérouvrier, V. Thiéry, A. Gagez, J. Bérard, N. Joguet, R. Kaas, J. Cadoret y L. Picot. 2015. Microwave-Assisted Extraction of Phycobiliproteins from *Porphyridium purpureum*. *Applied Biochemistry y Biotechnology* 175 (1). doi:10.1007/s12010-014-1250-2.
- Junge, W. 2019. Oxygenic photosynthesis: history, status y perspective. *Quarterly Reviews of Biophysics* 52. doi:10.1017/S0033583518000112.
- Kaňa, R., E. Kotabová, M. Lukeš, S. Papáček, C. Matonoha, L. N. Liu, O. Prášil y C. W. Mullineaux. 2014. Phycobilisome Mobility and Its Role in the Regulation of Light Harvesting in Red Algae. *Plant physiology* 165 (4): 1618–1631. doi:10.1104/pp.114.236075.
- Kannaujiya, V. K., D. Kumar, V. Singh y R. P. Sinha. 2021. Advances in phycobiliproteins research: innovations and commercialization. 57-81 p. En: Sinha, R. P. y Häder, D.-P. *Natural Bioactive Compunds*. Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-820655-3.00004-5.
- Kannaujiya, V. K., S. Sundaram y R. P. Sinha. 2017. Phycobiliproteins: Recent Developments y Future Applications. Singapore: Springer Singapore. doi:10.1007/978-981-10-6460-9.
- Kannaujiya, V., P. Singh, D. Kumar y R. Sinha. 2020. Phycobiliproteins in Microalgae: Occurrence, Distribution, and Biosynthesis. En: E. Jacob-Lopes, M. I. Queiroz y L. Queiroz-Zepka (Eds). 43-68 p. *Pigments from Microalgae Handbook*. Springer Nature Switzerland. doi:10.1007/978-3-030-50971-2_3.
- Kasote, D. M., G. K. Jayaprakasha y B. S. Patil. 2019. Leaf Disc Assays for Rapid Measurement of Antioxidant Activity. *Sci Rep* 1884 doi:10.1038/s41598-018-38036-x.
- Kavitha, M. D., M. H. Seema-Shree, S. Vidyashankar y R. Sarada. 2016. Acute y subchronic safety assessment of *Porphyridium purpureum* biomass in the rat model. *Journal of*

- Applied Phycology 28 (2): 1071–83. Springer Netherlands. doi:10.1007/s10811-015-0655-9.
- Kenny, O., N. P. Brunton y T. J. Smyth. 2015. In Vitro Protocols for Measuring the Antioxidant Capacity of Algal Extracts. *Methods Mol Biol.* 1308: 375-402 p. doi:10.1007/978-1-4939-2684-8_24.
- Khairinisa, G., W. Mahargyani y G. Agnia. 2022. Anti-Inflammatory Activity of the Peel Extract of Ambon Bananas (*Musa paradisiaca* L.) Examined With the Human Red Blood Cell Membrane Stabilization Method. *The 4th International Seminar. Global Health, KnE Medicine*, 216–223 p. doi:10.18502/kme.v2i2.11084.
- Khan, M. I., S. H. Shin y J. D. Kim. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, y optimization of a sustainable y renewable industry for biofuels, feed, y other products. *Microbial Cell Factories* 17 (1). doi:10.1186/s12934-018-0879-x.
- Khantaphant, S., S. Benjakul y M. R. Ghomi. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe redsnapper (*Lutjanus vitta*). *LWT Food Sci Technol* 44: 1139-1148 p. doi:10.1016/j.lwt.2010.10.009.
- Kim, Y., C. A. Latz, C. S. DeCarlo, S. Lee, C. Y. M. Png, P. Kibrik, E. Sung, O. Alabi y A. Dua. 2021. Relationship between blood type and outcomes following COVID-19 infection. *Seminars in vascular surgery* 34 (3): 125–131 p. doi:10.1053/j.semvascsurg.2021.05.005.
- Krienitz, L. 2009. Algae. In *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012370626-3.00132-0.
- Kuddus, M., P. Singh, G. Thomas y A. Al-Hazimi. 2013. Recent Developments in Production y Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Research International* 2013. doi:10.1155/2013/742859.
- Kuhn, V., L. Lukas Diederich, T. C. Stevenson-Keller 4th, C. M. Kramer, W. Lückstädt, C. Panknin, T. Suvorava, B. E. Isakson, M. Kelm y M. M. Cortese-Krott. 2017. Red Blood Cell Function y Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling* 26 (13). doi:10.1089/ars.2016.6954.
- Kumar, S., C. Rapalli, C. Krishna y V. Preedy. 2018b. Assessment of Antioxidant Potential of Dietary Components. doi:10.1016/B978-0-12-809853-0.00020-1.
- Kumar, S., P. K. Modak, A. S. Ali, S. Haroon, S. K. Barpanda, G. Vimal-Singh y R. Rupali. 2018. A retrospective study: ABO and Rh phenotype blood group distribution among blood donors in H.N.B. Base Hospital, Srinagar, Uttarakhand, India. *Journal of Family Medicine and Primary Care*: 7 (1): 34-38 p. doi:10.4103/jfmpe.jfmpe_252_17.
- Larkum, A. W. 2016. Photosynthesis y Light Harvesting in Algae. In *The Physiology of Microalgae*. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-24945-2_3.
- Larkum, A. W. D. 2020. Light-Harvesting in Cyanobacteria and Eukaryotic Algae: An Overview. 207-260 p. En: Larkum, A. W. D., Grossmann, A. R. y Raven, J. A. (Eds.), *Photosynthesis in Algae: Biochemical and Physiological Mechanisms, Advances in Photosynthesis and Respiration* 45. Springer, Suiza. doi:10.1007/978-3-030-33397-3_10.

- Lauceri, R., M. Bresciani, A. Lami y G. Morabito. 2017. Chlorophyll a interference in phycocyanin and allophycocyanin spectrophotometric quantification. *Journal of Limnology* 77 doi:10.4081/jlimnol.2017.1691.
- Lee, S., H. Kang, Y. Do, G. Lee, J. Kim, H. Han. 2016. High-precision THz Dielectric Spectroscopy of Tris-HCl Buffer. *Journal of the Optical Society of Korea*. 20: 431-434 doi:10.3807/JOSK.2016.20.3.431.
- Lemberg, R. y J. Legge. 1949. Hematin compounds y bile pigments. Interscience, New York.
- Li, S., H. N. Su, Y. Pu, J. Chen, L. N. Liu, Q. Liu y S. Qin. 2019. Phycobiliproteins: Molecular structure, production, applications and prodspects. *Biotechnology Advances* 37 (2). doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.01.008.
- Li, S., J. Liang, Q. Shi, H. Wu, J. Fan, Jianhua. 2019. Advances in the production of bioactive substances from marine unicellular microalgae *Porphyridium* spp. *Bioresource Technology*. 292. 122048. doi:10.1016/j.biortech.2019.122048.
- Lichtenthaler, H. K. y A. R. Wellburn. 1983. Determinations of Total Carotenoids and Chlorophylls a and B of Leaf Extracts in Different Solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591–592 p. doi:10.1042/bst0110591.
- Liu, H., H. Zhang, D. M. Niedzwiedzki, M. Prado, G. He, M. L. Gross y R. E. Blankenship. 2013. Phycobilisomes supply excitations to both photosystems in a megacomplex in cyanobacteria. *Science* 342 (6162): 1104–1107. doi:10.1126/science.12423212013. Phycobilisomes Supply Excitations to Both Photosystems in a Megacomplex in Cyanobacteria. *Science* 342 (6162). doi:10.1126/science.1242321.
- Liu, H., J. Ma y H. Wu. 2017. Detoxifying effects of ultrafiltration fractions of *Dendrobium aphyllum* peptides on chemical y AAPH-induced oxidative stress. *RSC Adv.* 7 (77). doi:10.1039/C7RA08957K.
- Liu, J. y D. Wang. 2022. ABO(H) and Lewis blood group substances and disease treatment. *Transfusion Medicine* 32 (3): 187-192 p. doi:10.1111/tme.12820.
- Liu, L.-N. 2016. Distribution y dynamics of electron transport complexes in cyanobacterial thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857 (3). doi:10.1016/j.bbabi.2015.11.010.
- Liu, S. y H. Huang. 2015. Assessments of antioxidant effect of black tea extract and its rationals by erythrocyte haemolysis assay, plasma oxidation assay y cellular antioxidant activity (CAA) assay. *Journal of Functional Foods* 18. doi:10.1016/j.jff.2014.08.023.
- Liu, X., P. Xiong, W. Li, H. H. Huang y Y. Zheng. 2019. Comparative studies of Tris-HCl, HEPES and NaHCO₃/CO₂ buffer systems on the biodegradation behaviour of pure Zn in NaCl and SBF solutions. *Corrosion Science*. 157. 10.1016/j.corsci.2019.05.018.
- López-Hernández, J. F., P. García.Alamilla, D. Palma-Ramírez, C. A. Álvarez-González, J. C. Paredes-Rojas y F. J. Márquez-Rocha. 2020. Continuous Microalgal Cultivation for Antioxidants Production. *Molecules* 25 (18). doi:10.3390/molecules25184171.
- Lorenzen, I., L. Mullen, S. Bekeschus y E. M. Hanschmann. 2017. Redox Regulation of Inflammatory Processes Is Enzymatically Controlled. *Oxidative Medicine y Cellular Longevity* 2017. doi:10.1155/2017/8459402.
- MacColl, R. 1998. Cyanobacterial Phycobilisomes. *Journal of Structural Biology* 124 (2–3). doi:10.1006/jsbi.1998.4062.

- Mailloux, R. J. 2016. Application of Mitochondria-Targeted Pharmaceuticals for the Treatment of Heart Disease. *Current pharmaceutical design* 22 (31): 4763–4779 p. doi:10.2174/1381612822666160629070914
- Manirafasha, E., T. Ndikubwimana, X. Zeng, Y. Lu y K Jing. 2016. Phycobiliprotein: Potential microalgae derived pharmaceutical and biological reagent. *Biochemical Engineering Journal* 109. doi:10.1016/j.bej.2016.01.025.
- Marcati, A., A. Ursu, C. Laroche, N. Soanen, L. Marchal, S. Jubeau, G. Djelveh y P. Michaud. 2014. Extraction and fractionation of polysaccharides and B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by membrane technology. *Algal Research*. 5. doi:10.1016/j.algal.2014.03.006.
- Martín-Ortega, A. M. y M. R. Segura-Campos. 2018. Bioactive Compounds as Therapeutic Alternatives. In *Bioactive Compounds: Health Benefits y Potential Applications*. Elsevier, 247–64. doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00013-X.
- Martins, M., B. P. Soares, J. H. P. M. Santos, P. Bharmoria, M. A. Torres-Acosta, A. C. R. V. Dias, J.A. P. Coutinho y S. P. M. Ventura. 2021. Sustainable Strategy Based on Induced Precipitation for the Purification of Phycobiliproteins. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 9 (10): 3942-3954 p. doi:10.1021/acssuschemeng.0c09218.
- Mattioli, R., L. Mosca, A. Sánchez-Lamar, I. Tempera y R. Hausmann. 2018. Natural Bioactive Compounds Acting against Oxidative Stress in Chronic, Degenerative, y Infectious Diseases. *Oxidative Medicine y Cellular Longevity*. doi:10.1155/2018/3894381.
- Medina-Cabrera, E. V., B. Rühmann, J. Schmid y V. Sieber. 2020. Characterization y comparison of *Porphyridium sordidum* y *Porphyridium purpureum* concerning growth characteristics and polysaccharide production. *Algal Research* 49. doi:10.1016/j.algal.2020.101931.
- Mendonça, J. d. S., R. d. C. A. Guimarães, V. A. Zorgetto-Pinheiro, C. D. P. Fernandes, G. Marcelino, D. Bogo, K. d. C. Freitas, P. A. Hiane, E. S. de-Pádua-Melo, M. L. B. Vilela y V. A. d. Nascimento. 2022. Natural Antioxidant Evaluation: A Review of Detection Methods. *Molecules* 27 (11): 3563. doi:10.3390/molecules27113563.
- Meo, S. F. Suraya, B. Jamil, F. A. Rouq, A. S. Meo, K. Sattar, M. J. Ansari y S. A. Alasiri. 2017. Association of ABO and Rh blood groups with breast cancer. *Saudi journal of biological sciences* 24 (7): 1609–1613 p. doi:10.1016/j.sjbs.2017.01.058
- Mogany, T., S. Kumari, F. M. Swalaha y F. Bux. 2020. An *in silico* structural y physiochemical analysis of C-Phycocyanin of halophile *Euhalothece* sp. *Algal Research* 51. doi:10.1016/j.algal.2020.102025.
- Montgomery, B. L. 2017. Seeing new light: recent insights into the occurrence y regulation of chromatic acclimation in cyanobacteria. *Current Opinion in Plant Biology* 37. doi:10.1016/j.pbi.2017.03.009.
- Munteanu, I. G. y C. Apetrei. 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (7): 3380. doi:10.3390/ijms22073380.
- Mutmainnah, N., Y. Risjani y A. M. S. Hertika. 2018. Growth Rate y Chemical Composition of Secondary Metabolite Extracellular Polysaccharide (EPS) in Microalga *Porphyridium*

- cruentum*. The Journal of Experimental Life Sciences 8 (2). doi:10.21776/ub.jels.2018.008.02.05.
- Mysliwa-Kurdziel, B. y K. Solymosi. 2017. Phycobilins y Phycobiliproteins Used in Food Industry y Medicine. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 17 (13). doi:10.2174/1389557516666160912180155.
- Nakai, K. y D. Tsuruta. 2021. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? International journal of molecular sciences 22 (19): 10799. doi:10.3390/ijms221910799.
- Naparło, K., M. Soszyński, G. Bartosz e I. Sadowska-Bartosz. 2020. Comparison of Antioxidants: The Limited Correlation between Various Assays of Antioxidant Activity. Molecules. 25 (14): 3244. doi:10.3390/molecules25143244.
- Nazih, H. y J.-M. Bard. 2018. Microalgae in Human Health. In Microalgae in Health y Disease Prevention. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-811405-6.00010-4.
- Neushul, M. 1970. A freeze-etching study of the red alga *Porphyridium*. American Journal of Botany 57 (10). doi:10.1002/j.1537-2197.1970.tb09929.x.
- Nguyen, G. T., E. R. Green y J. Mecsas. 2017. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation y Bacterial Resistance. Frontiers in Cellular y Infection Microbiology 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00373.
- Niki, E. 1990. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. Methods Enzymol. 186: 100–108 p.
- Noipa, T., S. Srijaranai, T. Tuntulani y W. Ngeontae. 2011. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. Food Res. Int. 44 (3): 798–806 p. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.034.
- Nuruki, Y., H. Matsumoto, M. Tsukada, H. Tsukahara, T. Takajo, K. Tsuchida y K. Anzai. 2021. Method to Improve Azo-Compound (AAPH)-Induced Hemolysis of Erythrocytes for Assessing Antioxidant Activity of Lipophilic Compounds. Chemical y Pharmaceutical Bulletin 69 (1). doi:10.1248/cpb.c20-00568.
- Nwoba, E. G., C. N. Ogbonna, T. Ishika y A. Valdiveloo. 2020. Microalgal Pigments: A Source of Natural Food Colors. 81-123 p. En: M. A. Alam, J.-L. Xu y Z. Wang (Eds). Microalgae Biotechnology for Food, Health y High Value Products. Springer. Singapur, Malasia. doi:10.1007/978-981-15-0169-2_3.
- O'Carra, P., R. F. Murphy y S. D. Killilea. 1980. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. Biochemical Journal 187 (2). doi:10.1042/bj1870303.
- Onishi, A., S. Aikawa, A. Kondo y S. Akimoto. 2015. Energy transfer in *Anabaena variabilis* filaments under nitrogen depletion, studied by time-resolved fluorescence. Photosynthesis Research 125 (1–2). doi:10.1007/s11120-015-0089-x.
- Ott, F. D. 1987. A Brief Review of the Species of *Porphyridium* with Additional Records for the Rarely Collected Alga *Porphyridium sordidum* Geitler, 1932 (Rhodophycophyta, Porphyridiales). Archiv für Protistenkunde 134 (1). doi:10.1016/S0003-9365(87)80024-6.

- Ou, Y., L. Lin, Q. Pan, X. Yang, y X. Cheng. 2012. Preventive effect of phycocyanin from *Spirulina platensis* on alloxan-injured mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34 (3). doi:10.1016/j.etap.2012.09.016.
- Ozgen, M., R. N. Reese, A. Z. Tulio, J. C. Scheerens y A. R. Miller. 2006. Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of agricultural and food chemistry* 54 (4): 1151–1157 p. doi:10.1021/jf051960d
- Palmer, J., D. Muñoz y C. Edwards. 2021. Biological activities of natural products from microalgae 287-324 p. En: Lafarga, T. y Ación, G. *Cultured Microalgae for the Food Industry: Current and Potential Applications*. doi:10.1016/B978-0-12-821080-2.00004-6.
- Parcheta, M., R. Swislocha, S. Orzechowska, M. Akimowicz, R. Choińska y W. Lewandoski. 2021. Recent Developments in Effective Antioxidants: The Structure and Antioxidant Properties. *Materials* 14 (8). doi:10.3390/ma14081984.
- Patel, A. K., C. Laroche, A. Marcati, A. V. Ursu, S. Jubeau, L. Marchal, E. Petit, G. Djelveh y P. Michaud. 2013. Separation y fractionation of exopolysaccharides from *Porphyridium cruentum*. *Bioresource Technology* 145. doi:10.1016/j.biortech.2012.12.038.
- Patel, H. 2021. Blood biocompatibility enhancement of biomaterials by heparin immobilization: a review. *Blood coagulation & fibrinolysis : an international journal in haemostasis and thrombosis* 32 (4): 237–247 p. doi:0.1097/MBC.0000000000001011.
- Pérez-Gálvez, A., I. Viera y M. Roca. 2020. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. *Antioxidants* 9 (6). doi:10.3390/antiox9060505.
- Pessoa, A., C. F. Miranda, M. Batista, M. Bosio, G. Marques, F. Nunes, R. M. Quinta-Ferreira y M. E. Quinta-Ferreira. 2019. Action of bioactive compounds in cellular oxidative response. *Energy Reports* 6 (1): 891-896 p. Elsevier, Amsterdam. doi:10.1016/j.egy.2019.11.035.
- Phaniendra, A., D. B. Jestadi y L. Periyasamy. 2015. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pignolet, O., S. Jubeau, C. Vaca-Garcia y P. Michaud. 2013. Highly valuable microalgae: biochemical y topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40 (8). doi:10.1007/s10295-013-1281-7.
- Pleonsil, P. y Y. Suwanwong. 2013. An in vitro study of c-phycocyanin activity on protection of DNA and human erythrocyte membrane from oxidative damage. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 5: 332-336 p.
- Pleonsil, P., S. Soogarun y Y. Suwanwong. 2013. Anti-oxidant activity of holo- and apo-c-phycocyanin and their protective effects on human erythrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 393-398 p. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.06.016.
- Pradhan, B., S. Patra, C. Behera, R. Nayak, B. P. Jit, A. Ragusa y M. Jena. 2021. Preliminary Investigation of the Antioxidant, Anti-Diabetic, and Anti-Inflammatory Activity of *Enteromorpha intestinalis* Extracts. *Molecules* 26 (4): 1171. doi:10.3390/molecules26041171.

- Queiroz, M. I., J. G. Vieira y M. M. Maroneze. 2020. Morphophysiological, structural, y metabolic aspects of microalgae. In Handbook of Microalgae-Based Processes y Products. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-818536-0.00002-6.
- Rana, R., V. Ranjan y N. Kumar. 2021. Association of ABO and Rh Blood Group in Susceptibility, Severity, and Mortality of Coronavirus Disease 2019: A Hospital-Based Study From Delhi, India. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11: 767-771 p. doi:10.3389/fcimb.2021.767771
- Rapido, F. 2017. The potential adverse effects of haemolysis. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue* 15 (3): 218–21. Edizioni SIMTI - SIMTI Servizi Srl. doi:10.2450/2017.0311-16.
- Razaghi, A., A. Godhe y E. Albers. 2014. Effects of nitrogen on growth and carbohydrate formation in *Porphyridium cruentum*. *Open Life Sciences* 9 (2). doi:10.2478/s11535-013-0248-z.
- Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* 10: 1231–1237 p. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Reboloso-Fuentes, M., G. G. Acién-Fernández, J. A. Sánchez-Pérez y J. L. Guil-Guerrero. 2000. Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry* 70 (3). doi:10.1016/S0308-8146(00)00101-1.
- Rebuglio-Velloso, J. C., L. Regasini, N. Khalil, V. S. Bolzani, O. Khalil, F. Manente, N. Pasquini, O. M. M. De Faria-Oliveira. 2017. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. *Ecletica Quimica*. 36. 7-20. doi:10.26850/1678-4618eqj.v36.2.2011.p07-20.
- Reddi, B. A. 2013. Why is saline so acidic (and does it really matter?). *International journal of medical sciences* 10 (6): 747–750. doi:10.7150/ijms.5868
- Regan, A. M. 2017. Blood Cell Antigens and Antibodies: Erythrocytes, Platelets and Neutrophils, 439-469 p. En: Bain, B. J., Bates, I. y Laffan, M. (Eds.), *Dacie and Lewis Practical Haematology*, Elsevier.
- Reilly, J. P., N. J. Meyer, M. G. Shashaty, B. J. Anderson, C. Ittner, T. G. Dunn, B. Lim, C. Forker, M. P. Bonk, E. Kotloff, R. Feng, E. Cantu, N. S. Mangalmurti, C. S. Calfee, M. A. Matthay, C. Mikacenic, K. R. Walley, J. Russell, D. C. Christiani, M. M. Wurfel y J. D. Christie, J. D. 2021. The ABO histo-blood group, endothelial activation, and acute respiratory distress syndrome risk in critical illness. *The Journal of clinical investigation* 131 (1): e139700. doi:10.1172/JCI139700.
- Riss, J., K. Décordé, T. Sutra, M. Delage, J. C. Baccou, N. Jouy, J. P. Brune, H. Oréal, J. P. Cristol y J. M. Rouanet. 2007. Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Is Powerfully Responsible for Reducing Oxidative Stress y NADPH Oxidase Expression Induced by an Atherogenic Diet in Hamsters. *Journal of Agricultural y Food Chemistry* 55 (19). doi:10.1021/jf070529g.
- Romay, C. y R. Gonzalez. 2000. Phycocyanin is an Antioxidant Protector of Human Erythrocytes Against Lysis by Peroxyl Radicals. *Journal of Pharmacy y Pharmacology* 52 (4). doi:10.1211/0022357001774093.

- Ruggiero, M. A., D. P. Gordon, T. M. Orrell, N. Bailly, T. Bourgoïn, R. C. Brusca, T. Cavalier-Smith, M. D. Guiry y P. M. Kirk. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PloS one* 10 (4) e0119248 doi:10.1371/journal.pone.0119248
- Ruiz-Cruz, S., R. I. González-Vega, R. E. Robles-Zepeda, A. Reyes-Díaz, J. A. López-Elías, M. L. Álvarez-Ainza, F. J. Cinco-Moroyoqui, R. A. Moreno-Corral, F. J. Wong-Corral, J. Borboa-Flores, Y. I. Cornejo-Ramírez y C. L. Del-Toro-Sánchez. 2022. Association of Different ABO and Rh Blood Groups with the Erythroprotective Effect of Extracts from *Navicula incerta* and Their Anti-Inflammatory and Antiproliferative Properties. *Metabolites* 12 (1203). doi:10.3390/metabo12121203.
- Sabir, A., A. Iftikhar, M. U. Ijaz, G. Hussain, A. Rasul, R. K. Iqbal, F. Sajid y H. Anwar. 2021. Retrospective study of frequency of ABO and Rhesus blood group among population of Safdarabad and Faisalabad cities of Pakistan. *BMC Res Notes* 14 (12). doi:10.1186/s13104-020-05429-z.
- Safi, C., M. Charton, O. Pignolet, P. Y. Ponyalier y C. Vaca-Garcia. 2013. Evaluation of the protein quality of *Porphyridium cruentum*. *Journal of Applied Phycology* 25 (2). doi:10.1007/s10811-012-9883-4.
- Santos-Sánchez, N. F., R. Salas-Coronado, C. Villanueva-Cañongo y B. Hernández-Carlos. 2019. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism. *Antioxidants IntechOpen*. doi:10.5772/intechopen.85270.
- Saran, S., N. Puri, N. D. Jasuja y G. Sharma. 2016. Optimization, Purification and characterization of Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*: 15-20.
- Sarmadi, B. H. y A. Ismail. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 31 (10): 1949-1956 p. doi:10.1016/j.peptides.2010.06.020.
- Scheer, H. y K.-H. Zhao. 2008. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology* 68 (2). doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06160.x.
- Seyedsadjadi, N. y R. Grant. 2020. The Potential Benefit of Monitoring Oxidative Stress y Inflammation in the Prevention of Non-Communicable Diseases (NCDs). *Antioxidants* 10 (1). doi:10.3390/antiox10010015.
- Shahid-Ud-Daula, A. F. M., A. S. Kamariah, L. Lim, Linda y N. Ahmad. 2015. Phytochemical screening, antioxidant, and antimicrobial activities of leaves, stems, and rhizomes of *Etilingera coccinea* (Blume) S. Sakai & Nagam. 7: 873-883 p.
- Shahidi, F. y P. Ambigaipalan. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *J. Funct. Foods* 18: 820–897 p. doi:10.1016/J.JFF.2015.06.018.
- Shahidi, F., y Y. Zhong. 2015. Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18: 757–781 p. doi:10.1016/j.jff.2015.01.047.
- Sharifi-Rad, M., N. V. Anil-Kumar, P. Zucca, E. M. Varoni, L. Dini, E. Panzarini, J. Rajkovic, P. V. Tsouh-Fokou, E. Azzini, I. Peluso, A. Prakash-Mishra, M. Nigam, Y. El-Rayess, M. E. Beyrouthy, L. Polito, M. Iriti, N. Martins, M. Martorell, A. O. Docea, W. N. Setzer, D. Calina, W. C. Cho y J. Sharifi-Rad. 2020. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in physiology* 11: 694. doi:10.3389/fphys.2020.00694.

- Siddeeg, A., N. M. AlKehayez, H. A. Abu-Hiamed, E. A. Al-Sanea y A. M. Al-Farga. 2021. Mode of action y determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28 (3). doi:10.1016/j.sjbs.2020.11.064.
- Siddon, A. J. y C. A. Tormey. 2019. The chemical and laboratory investigation of hemolysis. *Advances in clinical chemistry* 89: 215–258 p. doi:10.1016/bs.acc.2018.12.006.
- Sies, H. 1985. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In *Oxidative Stress*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-642760-8.50005-3.
- Sies, H. y D. Jones. 2007. Oxidative Stress. In *Encyclopedia of Stress*. Elsevier. doi:10.1016/B978-012373947-6.00285-3.
- Sikora J. P., J. Sobczak, D. Zawadzki, P. Przewratil, A. Wysocka y M. Burzyńska. 2021. Respiratory Burst and TNF- α Receptor Expression of Neutrophils after Sepsis and Severe Injury-Induced Inflammation in Children. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18 (4): 2187. doi:10.3390/ijerph18042187.
- Smart, E., Armstrong, B. y E. Lee. 2020. Blood group systems. *VOXS* 15: 123-150 p. doi:10.1111/voxs.12593.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson y D. C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150 (1). doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Smyth, M. J., G. P. Dunn y R. D. Schreiber. 2006. Cancer Immunosurveillance y Immunoediting: The Roles of Immunity in Suppressing Tumor Development y Shaping Tumor Immunogenicity. doi:10.1016/S0065-2776(06)90001-7.
- Snezhkina, A. V., A. V. Kudryavtseva, O. L. Kardymon, M. V. Savvateeva, N. V. Melnikova, G. S. Krasnov y A. A. Dmitriev 2019. ROS Generation y Antioxidant Defense Systems in Normal y Malignant Cells. *Oxidative Medicine y Cellular Longevity* doi:10.1155/2019/6175804.
- Sonani, R. R., N. K. Singh, J. Kumar, D. Thakar y D. Madamwar. 2014. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: an antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochem* 49 (10): 1757-1766 p. doi:10.1016/j.procbio.2014.06.022.
- Sonani, R. R., R. P. Rastogi y D. Madamwar. 2015. Antioxidant Potential of Phycobiliproteins: Role in Anti-Aging Research. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 04 (02). doi:10.4172/2161-1009.1000172.
- Sonmez, M., H. Y. Ince, O. Yalcin, V. Ajdžanović, I. Spasojević y H. J. Meiselman. 2013 The Effect of Alcohols on Red Blood Cell Mechanical Properties and Membrane Fluidity Depends on Their Molecular Size. *PLoS ONE* 8 (9): e76579. doi:10.1371/journal.pone.0076579.
- Sreenikethanam, A., R. B. S. Raj, P. Gugulothu, y A. K. Bajhaiya. 2022. Genetic Engineering of Microalgae for Secondary Metabolite Production: Recent Developments, Challenges, and Future Prospects. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 10: 836056. doi:10.3389/fbioe.2022.836056.

- Sun, Y., C. Yang y R. Tsao. 2017. Nomenclature and general classification of antioxidant activity/capacity assays: Recent Trends and Applications. doi:10.1002/9781119135388.ch1.
- Takaichi, S. 2011. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses y Functions. *Marine Drugs* 9 (6). doi:10.3390/md9061101.
- Takaichi, S. 2013. Tetraterpenes: Carotenoids. In *Natural Products: Phytochemistry, Botany y Metabolism of Alkaloids, Phenolics y Terpenes* editado por Ramawat Kishan Gopal y Mérillon, Jean-Michel. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 3251–83. doi:10.1007/978-3-642-22144-6_141.
- Tan, B. L., M. E. Norhaizan, W. P. Liew y H. Sulaiman Rahman. 2018. Antioxidant y Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology* 9. doi:10.3389/fphar.2018.01162.
- Thomas, D. C. 2017. The phagocyte respiratory burst: Historical perspectives y recent advances. *Immunology Letters* 192. doi:10.1016/j.imlet.2017.08.016.
- Tonog, P. y A. D. Lakhkar. 2021. Normal Saline. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Tran, T., C. Lafarge, R. Pradelles, J. M. Perrier-Cornet, N. Cayot y C. Loupiac. 2019. Effect of high hydrostatic pressure on the structure of the soluble protein fraction in *Porphyridium cruentum* extracts. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 58. doi:10.1016/j.ifset.2019.102226.
- Triantis, T., E. Yannakopoulou, A. Nikokavoura, D. Dimotikali y K. Papadopoulos. 2007. Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids. *Analytica Chimica Acta* 591: 106-111p. doi:10.1016/j.aca.2007.03.054.
- Truong, D. H., Ta, N. T. A., Pham, T. V., Huynh, T. D., Do, Q. T. G., Dinh, N. C. G., Dang, C. D., Nguyen, T. K. C., & Bui, A. V. (2021). Effects of solvent-solvent fractionation on the total terpenoid content and in vitro anti-inflammatory activity of *Serevenia buxifolia* bark extract. *Food science & nutrition* 9 (3): 1720–1735 p. doi:10.1002/fsn3.2149.
- Tsaloglou, M.-N. 2016. *Microalgae: Current Research y Applications*. Caister Academic Press. doi:10.21775/9781910190272.
- Tsamesidis, I., P. Pério, A. Pantaleo y K. Reybier. 2020. Oxidation of Erythrocytes Enhance the Production of Reactive Species in the Presence of Artemisinins. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (13). doi:10.3390/ijms21134799.
- van-der-Schoot, C. E., D. Winkelhorst y F. B. Clausen. 2018. Chapter 8 Noninvasive Fetal Blood Group Typing, 125-156 p. En: Page-Christiaens, L. y K. Hanns-Georg Noninvasive Prenatal Testing (NIPT) Applied Genomics in Prenatal Screening and Diagnosis. doi:10.1016/C2017-0-00889-3.
- Vasileva, Iv. y J. Ivanova. 2019. BIOCHEMICAL PROFILE OF GREEN Y RED ALGAE – A KEY FOR UNDERSTANDING THEIR POTENTIAL APPLICATION AS FOOD ADDITIVES. *Trakia Journal of Sciences* 17 (1). doi:10.15547/tjs.2019.01.001.
- Vege, S. y C. M. Westhoff, C. M. 2019. Rh and RhAG Blood Group Systems. *Transfusion Medicine and Hemostasis*, 149–155. doi:10.1016/b978-0-12-813726-0.00026-x
- Villamena, F. A. 2017. Chemistry of Reactive Species. In *Reactive Species Detection in Biology*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-12-420017-3.00005-0.

- Vonshak, A., Z. Cohen y A. Richmond. 1985. The feasibility of mass cultivation of *Porphyridium*. *Biomass* 8 (1). doi:10.1016/0144-4565(85)90032-0.
- Webb, K. L., P. B. Dominelli, S. E. Baker, S. A. Klassen, M. J. Joyner, J. W. Senefeld y C. C. Wiggins, 2022. Influence of High Hemoglobin-Oxygen Affinity on Humans During Hypoxia. *Frontiers in physiology* 12 (763933). doi:3389/fphys.2021.763933.
- Weber, M., H. Steinle, S. Golombek, L. Hann, C. Schlensak, H. P. Wendel y M. Avci-Adali. 2018. Blood-Contacting Biomaterials: In Vitro Evaluation of the Hemocompatibility. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 6 (99). doi:10.3389/fbioe.2018.00099.
- Wellburn, A. R. 1994. The spectral determination of chlorophyll a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144: 307-313 p. doi:10.1016/S0176-1617(11)81192-2.
- Xia, C., Z. Dai, Y. Jin y P. Chen. 2021. Emerging Antioxidant Paradigm of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Therapy. *Frontiers in Endocrinology* 12. doi:10.3389/fendo.2021.727272.
- Ximenes, V. F., M. G. Lopes, M. S. Petrônio, L. O. Regasini, D. H. Silva y L. M. da-Fonseca. 2010. Inhibitory effect of gallic acid and its esters on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)hydrochloride (AAPH)-induced hemolysis and depletion of intracellular glutathione in erythrocytes. *J. Agric. Food Chem.* 58: 5355–5362 p. doi:10.1021/jf100233y.
- Xu, D., N. Sun, S. Xuan, C. Wang, T. Huang, C. Li, J. Zhang y W. Yang. 2020. Effect of different drying methods on the physicochemical properties and phycobiliprotein structure of *Porphyra haitanensis*. *International Journal of Food Engineering*. 17. doi:10.1515/ijfe-2020-0081.
- Yalamanoglu, A., J. W. Deuel, R. C. Hunt, J. H. Baek, K. Hassell, K. Redinius, D. C. Irwin, D. J. Schaer y P. W. Buehler. 2018. Depletion of haptoglobin y hemopexin promote hemoglobin-mediated lipoprotein oxidation in sickle cell disease. *American Journal of Physiology-Lung Cellular y Molecular Physiology* 315 (5). doi:10.1152/ajplung.00269.2018.
- Yamasaki, H., J. W. Deuel, R. C. Hunt, J. H. Baek, K. Hassell, K. Redinius, D. C. Irwin, D. J. Schaer y P. W. Buehler. 2019. d-Cysteine-Induced Rapid Root Abscission in the Water Fern *Azolla Pinnata*: Implications for the Linkage between d-Amino Acid y Reactive Sulfur Species (RSS) in Plant Environmental Responses. *Antioxidants* 8 (9). doi:10.3390/antiox8090411.
- Yesmin, S., A. Paul, T. Naz, A. B. M. Atiqur-Rahman, S. F. Akhter, M. I. Ibne-Wahed, T. B. Emran y S. A. Siddiqui. 2020. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of ethanolic root extract of Choi (*Piper chaba*). *Clin Phytosci* 6: 59. doi:10.1186/s40816-020-00207-7.
- Zeng M. Y., I. Miralda, C. L. Armstrong, S. M. Uriarte y J. Bagaitkar. 2019. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Molecular Oral Microbiology* 34 (2): 27-38 p. doi:10.1111/omi.12252.
- Zhang, Z., P. H. Lambrev, K. L. Wells, G. Garab y S. Tan. 2015. Direct observation of multistep energy transfer in LHCII with fifth-order 3D electronic spectroscopy. *Nature Communications* 6 (1). doi:10.1038/ncomms8914.

X. APÉNDICE

Hermosillo, Sonora 24 de octubre de 2022

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO: “Evaluación del potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum*”

Se le invita a participar en este estudio de investigación, realizado por la Universidad de Sonora en el Departamento de Investigación de Posgrado de Alimentos (DIPA) ubicado en el edificio 5H planta alta en el Laboratorio de Biotecnología. El objetivo del estudio es la obtención de sangre periférica para el empleo de las membranas eritrocitarias como modelos de membranas con distintos antígenos de superficie para determinar la asociación de los diferentes grupos sanguíneos con el efecto eritroprotector de extractos derivados de la microalga *Porphyridium cruentum*. Los resultados podrían ser aprovechados en el área de la salud para prevenir enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), generando así, más opciones naturales quimiopreventivas. Atendiendo a las recomendaciones de la O. M. S. para promover el uso de recursos naturales en la quimioprevención de patologías crónico-degenerativas de alto impacto social.

Si usted desea participar de manera voluntaria necesita contar con los siguientes requisitos:

1. Contar con la edad de entre 25 a 40 años
2. Tener un peso entre 50 a 80 kg
3. Presentar un conteo eritrocitario aproximado de 4.7 a 6.1×10^6 cél/ μ L
4. Presentar valores de hemoglobina normales (mujeres: 11.6 a 15 g/dL; Hombres: 13.2 a 16.6 g/dL)
5. No haber consumido alcohol al menos 48 horas antes
6. No tener hábitos frecuentes de tabaquismo
7. No consumir drogas o estupefacientes
8. No presentar enfermedades bacterianas, virales o fúngicas
9. No tener enfermedades crónicas relacionadas con la sangre

El propósito del estudio es determinar la capacidad de los pigmentos de *P. cruentum* de reducir compuestos oxidados para inhibir la oxidación celular.

Los radicales libres (RL) son moléculas altamente reactivas que pueden ocasionar hemólisis oxidativa en eritrocitos humanos, ocasionando peroxidación lipídica y degradación de la membrana plasmática. Para evaluar la capacidad de inhibición de RL se utiliza el ensayo de actividad anti-hemolítica *in vitro*. La hemólisis se lleva a cabo mediante el generador de radicales libres AAPH (2,2'-azobis-[2-methylpropionamidine]), la exposición ante una solución hipotónica y calor, utilizando eritrocitos humanos como modelo celular. El efecto protector de

los pigmentos sobre los eritrocitos humanos se logra inhibiendo la oxidación celular inducida. No obstante, se requiere una suspensión de glóbulos rojos, la cual se obtiene mediante venopunción.

A continuación, se mencionarán las indicaciones del procedimiento para la extracción de sangre venosa:

- a) Cuando el voluntario se encuentre listo para donar la muestra, tendrá que estar físicamente en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Universidad de Sonora (LACIUS).
- b) Una vez dentro del LACIUS, se dirigirá a un sitio exclusivo que se le asignará para la donación.
- c) El sitio donde se llevará a cabo la venopunción se encontrará sanitizado y desinfectado (antiséptico).
- d) El profesional de la salud se realizará un lavado higiénico de manos con solución hidroalcohólica durante 30 segundos realizada por el profesional de salud antes de iniciar el procedimiento.
- e) El voluntario se sentará cómodamente mientras el profesional de la salud explicará el procedimiento.
- f) Forma que se realizará el procedimiento:
 - El procedimiento se realizará en una vena visible o palpable, por el cual se perforará por vía transcutánea con una aguja o catéter. Procedimiento que consiste en recoger la muestra biológica en un vial estéril con anticoagulante (EDTA).
 - Primero, el sitio se limpia con una torunda empapada con un antiséptico. La dirección de la torunda se realiza de arriba hacia abajo, repitiendo este movimiento hasta cubrir el área. Cada vez que se pase la torunda, esta se cambiará de posición para evitar contaminar el área desinfectada.
 - Se colocará una banda o compresor alrededor de la parte superior del brazo con el fin de aplicar presión en la zona. Esto hará que la vena que se encuentra debajo de la banda se llene de sangre.
 - Se introduce una aguja o catéter por vía transcutánea en la vena.
 - La sangre se recolectará en un frasco hermético y estéril.
 - Se retira la banda elástica del brazo.
 - Se retira el tubo hermético con cuidado y posteriormente la aguja.
 - El sitio se cubre con un vendaje para detener el sangrado.
- g) Al terminar el profesional de la salud desechará la aguja en un contenedor especial para artículos pulso-cortantes de color rojo que corresponde a los residuos peligrosos biológicos-infecciosos (RPBI).

- h) Al terminar el proceso de venopunción, el profesional de la salud entregará la muestra al investigador para procesar la muestra inmediatamente.

Toda la información que se proporcione para el estudio será estrictamente confidencial, únicamente utilizada para fines científicos y no se encontrará disponible para ningún otro propósito. Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria y no tendrá ningún costo. Para cualquier duda podrá solicitar información al investigador responsable

Dra. Carmen Lizette Del Toro Sánchez
6622592207 Ext. 4891
Horario: 9:00 am-3:00 pm
Celular: 6624709179

Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México.

Si tiene alguna duda sobre este proyecto, puede hacer preguntas en cualquier momento durante su participación en él. Igualmente, puede retirarse del proyecto en cualquier momento sin que eso lo perjudique en ninguna forma.

Desde este momento le agradecemos su participación.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Declaro que se me ha explicado claramente los objetivos del estudio “Evaluación del potencial eritroprotector de las ficobiliproteínas procedentes de *Porphyridium cruentum*”. Tras haber recibido información verbal clara y sencilla y leer este escrito explicativo sobre la toma de muestras biológicas, he podido hacer preguntas y aclarar mis dudas sobre ¿Qué es? ¿Cómo se hace? ¿Para qué sirve? ¿Qué riesgos conlleva el procedimiento? y ¿Por qué es importante en mi caso? Así, tras haber comprendido la información recibida, doy libremente mi consentimiento para la realización de dicho procedimiento. También se me ha indicado que puedo tener una copia de este documento y que puedo revocar el consentimiento en cualquier momento. Por lo tanto, acepto participar voluntariamente en esta investigación, conducida por la Dra. Dian Fimbres Olivaría y el Dr. Ricardo Iván González Vega. He sido informado (a) de que la meta de este estudio es: la obtención sangre periférica como medio de estudio para determinar el efecto eritroprotector de pigmentos extraídos de *P. cruentum* para inhibir la hemólisis oxidativa utilizando eritrocitos humanos como modelo celular.

Reconozco que la información que yo provea en el curso de esta investigación es estrictamente confidencial y no será usada para ningún otro propósito fuera de los de este estudio sin mi consentimiento. He sido informado de que puedo hacer preguntas sobre el proyecto en cualquier momento y que puedo retirarme del mismo cuando así lo decida, sin que esto acarree perjuicio alguno para mi persona. De tener preguntas sobre mi participación en este estudio le informaré al Dr. Ricardo Iván González Vega al teléfono 6623461577.

Entiendo que una copia de esta ficha de consentimiento me será entregada, y que puedo pedir información sobre los resultados de este estudio cuando este haya concluido.

Nombre: _____ **Fecha:** _____

Edad: _____

Peso: _____

Firma del voluntario

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2