

## I. RESUMEN

La investigación que se presenta a continuación, muestra el aislamiento, la purificación e identificación de cepas de microalgas del litoral atlántico de Guatemala, con el fin de constituir un estudio preliminar para futuras investigaciones que sugieran el uso en el campo farmacéutico de los especímenes encontrados.

La toma de muestras se realizó en el litoral atlántico del país, siendo los puntos de muestreo: Río Dulce, desde la frontera con Belice pasando por Puerto Barrios hasta llegar a Punta de Manabique. Para su recolección se utilizó una red de fitoplancton. Gran parte de las muestras fueron transportadas en hieleras debido a que la temperatura baja permite disminuir la actividad biológica de las microalgas y esto consigue evitar que mueran por estrés o que el fitoplancton se alimente de ellas, las muestras restantes fueron fijadas con lugol en el lugar de muestreo para preservarlas y poder identificarlas posteriormente con facilidad.

Se observaron en un microscopio invertido varias gotas de agua, identificando con ayuda de claves dicotómicas quince diferentes cepas de microalgas, donde predominaron las diatomeas (*Melosira sp*, *Thalassiosira sp*, *Coscinodiscus sp*, *Rhizosolenia sp*, *Chaetocero sp*, *Bacteriastrum sp*, *Odontella aurita*, *Odontella longicuris*, *Thalassionema sp*, *Navicula sp*, *Nitzschia longissima*) sobre dinoflagelados (*Ceratium trichoceros*, *Ceratium fusus*, *Ceratium tripos*, *Ceratium furca*).

Una vez identificadas las cepas predominantes en las muestras se procedió al aislamiento de las mismas, utilizando como técnica la micromanipulación se aislaron en frascos de 500 ml que contenían medio f/2 (anexo no. 1). Los frascos fueron colocados en estanterías con luz artificial, para que en cada uno de los cultivos inoculados se reprodujeran las microalgas aisladas. De estos frascos se tomaron segundas muestras donde se observó con más claridad como los pocos dinoflagelados encontrados en la primera etapa, fueron desapareciendo como consecuencia de dos principales factores; fragilidad debido a su exoesqueleto de sílice y menor resistencia al estrés durante el proceso de micromanipulación, y no solo siguieron predominando las diatomeas, si no, se reprodujeron sin ningún inconveniente.

Todas las diatomeas identificadas se aislaron, tomando con capilares células de las muestras e inoculándolas en tubos de 20 ml que contenían también medio nutritivo f/2 (anexo no. 1). Se aislaron únicamente cinco especies; *Melosira sp*, *Coscinodiscus sp*, *Odontella aurita*, *Odontella longicruris*, *Navicula sp*.

Es así que a partir de estas cinco especies se procedió con la purificación, pues en este punto aun se encontraban hasta cierto punto, mezcladas unas especies con otras y se observaban muchas bacterias.

Por lo que siempre usando la micromanipulación se fueron separando células, inoculando en tubos nuevos, hasta que se consiguió, obtener las cinco cepas aisladas y purificadas.

Como último paso, se hizo una revisión bibliográfica de los estudios que se han presentado acerca de sus posibles usos en el campo farmacéutico y se encontraron pocos resultados, y ningún artículo publicado en Guatemala.

Por lo que se concluyó que Guatemala es un país lleno de recursos naturales, que pueden explotarse con racionalidad, y esta investigación cumplió su función de ser un primer paso para la investigación de las microalgas en este campo, dentro del país, y podrá sentar un precedente para ser utilizado en investigaciones posteriores que enriquezcan a la comunidad científica.

## II. INTRODUCCION

Las algas son talófitos (organismos que carecen de raíz, tallo, hojas); tienen clorofila junto con otros pigmentos acompañantes y carecen de estructuras estériles rodeando a las células reproductoras. Son principalmente plantas acuáticas macroscópicas y microscópicas, que se encuentran en el agua salada, salobre y dulce. Viven suspendidas o flotan en la superficie del agua o cerca de ésta. (4) Existen unas 30,000 especies de algas, la mayoría de las cuales son marinas. (5) Hay algas unicelulares, móviles e inmóviles. Las formas y las dimensiones son muy diversas; la mayoría son de tamaño microscópico, su reproducción puede ser asexual y sexual (6)

Las microalgas fueron los primeros organismos con capacidad de fotosíntesis y uno de los principales agentes en la creación de la actual atmósfera terrestre. Estos organismos son claves en el equilibrio planetario, ya que la dinámica del dióxido de carbono en la Tierra está, en gran medida, determinada por ellos y, además, constituyen la base de las cadenas tróficas que permiten la vida en los océanos, Son organismos apenas explorados, que en la actualidad son objeto de intensas investigaciones para la búsqueda de nuevas sustancias bioactivas susceptibles de ser utilizadas en medicina o de nuevos usos productivos como la elaboración de biocombustibles. (7, 8)

El presente trabajo es un aporte a estudios de la flora ficológica de Guatemala, con el cual se pretende establecer una base para futuras investigaciones en el campo farmacéutico de este tópico.

Teniendo como objetivo general aislar, purificar e identificar las cepas de microalgas nativas del litoral atlántico de Guatemala, a poca profundidad.

Se identificaron las microalgas, haciendo uso de un microscopio, donde se analizaron gotas de agua de las diferentes muestras recolectadas, luego se aislaron utilizando como herramienta la micromanipulación e inoculando las especies en frascos y tubos con una solución nutritiva, finalmente se purificaron, tomando las colonias que crecieron en tubos y frascos inoculados para separarlas en nuevos y diferentes tubos con medio f/2, y se elaboró un cepario con las especies identificadas, que quede a disposición de la comunidad científica, para estudios posteriores.

### III. ANTECEDENTES

#### 1. Generalidades

Las algas tienen tejidos relativamente indiferenciados que nunca llegan a formar verdaderas raíces, hojas o tallos. La mayoría contienen clorofila y son fotoautótrofas. El cuerpo de la planta se llama talo, término empleado aun en las algas unicelulares. (4)

Aunque las algas pasan fácilmente inadvertidas, son plantas muy comunes, típicamente acuáticas, de agua dulce o de agua salada, y se las encuentra hasta en los manantiales del desierto y en algunos lagos temporales. (4)

Las diferentes especies exhiben gran variedad de colores que pueden ir desde el verde, verde amarillento y verde azulado hasta el rojo, anaranjado, verde oliva y pardo. Se presentan en formas muy diversas, como pelotas, filamentos, hojas, cintas y gran número de figuras ramificadas. Muchas especies unicelulares son microscópicas y flotan o nadan libremente. (5)

El crecimiento y la reproducción normal de las algas, dependen de ciertos factores ambientales, como temperatura y luz favorables, y de un suministro adecuado de oxígeno, anhídrido carbónico y elementos esenciales. Puesto que el agua absorbe la luz, gran parte de las algas que viven sumergidas tienen un punto de compensación relativamente bajo, y pueden clasificarse como tolerantes a la sombra. La profundidad en que son capaces de desarrollarse las algas depende de la penetración de la luz necesaria para la fotosíntesis. (5)

Las algas actúan en el medio en que viven, modificando las propiedades físico químicas del mismo. De ellas depende en gran medida la transparencia o grado de turbidez y el color de las aguas. Su multiplicación exagerada modifica las propiedades tecnológicas del agua e impide muchas veces su uso. (6)

Si bien las algas son organismos poco exigentes y capaces de adaptarse, cada especie tiene requerimientos propios y crecen en biótupos bien determinados, y si en ellos las condiciones se modifican, mueren o desaparecen. Por sus tipos morfológicos tienden a integrar, en algunos casos, comunidades bien definidas. (9)

Las formas microscópicas unicelulares o diminutas en suspensión en el agua componen el fitoplancton. Mientras que el bentos es un conjunto de organismos que viven en y sobre el fondo, las algas bentónicas, normalmente son formas unicelulares macroscópicas. El perifiton está compuesto por organismos unicelulares o multicelulares simples, adheridos a un sustrato, vivo o inanimado, por medio de secreciones o estructuras especializadas. (9)

Las algas son responsables de diferentes fenómenos, dependiendo esto del tipo de alga y el medio ambiente en el cual se desarrollan. Actualmente se presta cada vez más atención a las algas que generan sustancias tóxicas que causan la muerte de muchos animales salvajes y domésticos. Sin embargo, hay pocos informes relativos a algas tóxicas para el hombre, aunque en ocasiones, se sospecha de algunas que hayan sido causa de ciertos brotes de afecciones gastrointestinales observados entre usuarios del mismo aprovisionamiento de agua. (11)

## **2. Reproducción**

### **2.1. Reproducción asexual**

Puede darse de tres formas: división celular, fragmentación y formación de zoosporas. (16)

Numerosas algas unicelulares se reproducen por simple división celular para formar dos células hijas, convirtiéndose cada una en un individuo nuevo. Esto puede ser el único método de reproducción en estas especies, pero en algunos casos está asociado con otros procedimientos, como la separación inmediata de las células hijas o su agrupamiento temporal. (16)

La reproducción por fragmentación ocurre cuando colonias maduras, no filamentosas, se escinden en dos o más porciones, o cuando se desprenden filamentos u otros órganos complejos. Este tipo de reproducción asexual es muy común, no solo en las ovas más diminutas de las lagunas sino también en las grandes algas rojas y pardas. En estos dos grupos, segmentos enteros del cuerpo de la planta se desprenden para formar nuevos individuos, y como el cuerpo de la planta no es un órgano muy especializado, cualquier fragmento de mediano tamaño proseguirá su desarrollo con condiciones ambientales favorables. (16)

La reproducción asexual con zoosporas es también muy común. Las zoosporas como su nombre lo indica, tienen semejanza con los seres animales. Estas unidades reproductoras unicelulares poseen membrana celular, pero no una verdadera pared celular. Son células móviles que nadan libremente y se desplazan por la acción de uno o varios flagelos, filamentos en forma de látigo que le salen a la zoospora en una de sus extremidades o lateralmente. La célula vegetativa da origen a una o varias zoosporas, que son liberadas al romperse la membrana de la célula madre. De cada zoospora podrá surgir una nueva planta. (16)

## **2.2. Reproducción sexual**

Implica la producción de gametos. El gameto es una célula que genera un individuo nuevo después de haberse fusionado con otro gameto. En las algas hay dos tipos de reproducción sexual la isogamia y la oogamia. (16)

En la isogamia, los gametos son aproximadamente del mismo tamaño y con frecuencia móviles. Si, como sucede en la mayoría de los casos, el cigoto resultante es de paredes gruesas y permanece en estado de latencia, se le llamará zigospora. (16)

En la oogamia, los gametos son de tamaño diferentes; el femenino, grande e inmóvil, es fecundado por el espermatozoide o gameto masculino, pequeño y móvil. Se llamará oóspora al cigoto, que en lugar de germinar inmediatamente pasa antes por un período de reposo. (16)

## **3. Función de las algas en la naturaleza**

Las algas ocupan el primer eslabón de la cadena alimenticia en el ambiente acuático. Son productores primarios capaces de elaborar sustancias orgánicas a partir de sustancias inorgánicas, transformando la energía luminosa que proviene del sol en energía química. Esta es la esencia de la fotosíntesis. (15)

Las algas que forman parte del fitoplancton son aquellas que viven libres en la masa de agua. Ellas sirven de alimento al zooplancton, del que luego se nutren distintos tipos de carnívoros. Este ciclo se cierra por acción de los hongos y bacterias que descomponen la sustancia orgánica en elementos y compuestos inorgánicos. (15)

En cambio, las algas bentónicas son las que crecen fijas al sustrato, tanto en el ambiente marino como en el de agua dulce, cumpliendo un rol similar al del fitoplancton. (15)

Además de ser el primer eslabón en las cadenas alimenticias, las algas del bentos tienen un papel muy importante en la organización espacial de las comunidades marinas. Las más pequeñas forman céspedes y son accesibles a los organismos que se alimentan raspando el fondo. Las más grandes -como los bosques de Laminariales- proveen de apoyo y refugio a los animales que caracterizan comunidades complejas. Estos pueden desarrollarse entre las algas, bajo su dosel, sobre su superficie y aún en galerías que perforan dentro de las más voluminosas. (15)

#### **4. Ecología de las algas marinas**

Como todos los organismos vivos, las algas están sometidas a la serie de condicionantes vitales que constituyen su propio hábitat marino. (19)

La presencia de las algas se halla limitada por la luz, que necesitan para la fotosíntesis. De manera que se hallan restringidas a las profundidades en las que existe suficiente iluminación. La turbidez elevada en el mar restringe la iluminación y por consiguiente el crecimiento de los vegetales, y sólo determinadas especies son capaces de vivir en la iluminación reducida característica de las cuevas. (19)

##### **4.1. La luz, condición esencial**

La luz es un factor muy complejo que influye de diferentes maneras: según la cantidad (intensidad luminosa), la calidad (naturaleza de las radiaciones), o el fotoperíodo (duración de los períodos de luz y oscuridad). (19)

El fotoperíodo es un factor de gran importancia pero poco conocido actualmente. Sus alteraciones pueden ser responsables del desarrollo de especies estacionales o del desencadenamiento de ciclos de reproducción. (19)

La calidad de la luz está directamente relacionada con las radiaciones diferentes que la componen. Estas radiaciones van siendo absorbidas por la masa de agua a medida que aumenta la profundidad. (19)

Las radiaciones de longitud de onda superior a 600 nm (rojo) son absorbidas ya en los primeros metros. A unos 10 m de profundidad en océano abierto y agua clara, el espectro de luz visible se reduce a una estrecha banda entre 450 y 550 nm (azul). En las zonas litorales, que suelen presentar mayor turbidez que el océano abierto, el espectro luminoso se estrecha aun más rápidamente y a los 10 m la luz es ya verde. Los distintos grupos de algas poseen, además de clorofila, diferentes tipos de pigmentos relacionados con la captura de la energía luminosa y que, según su naturaleza, absorberán mejor o peor las radiaciones de diferentes longitudes de onda. (19)

#### **4.2. El sustrato**

Las microalgas se encuentran suspendidas en agua, ya que así tienen un mejor acceso al CO<sub>2</sub> y otros nutrientes. Se encuentran ampliamente distribuidas en la biosfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones. (18)

Las algas bentónicas son organismos que necesitan vivir fijados sobre algún tipo de soporte para llevar un desarrollo normal. No poseen un aparato radical y no extraen sus nutrientes del sustrato sino directamente del medio que las baña, por lo que, en principio, la naturaleza química del sustrato no es crucial en su desarrollo y puede ser cualquier tipo de soporte, desde una roca al casco de un barco, incluso cualquier otro organismo animal o vegetal, (de cualquier forma, la textura y grado de cohesión son dos características importantes a considerar en este soporte). (18)

Hay algas epífitas o endófitas (según vivan sobre o en el interior de un vegetal) y epizoicas o endozoicas (sobre o en el interior de un animal). También se conocen casos de algas unicelulares simbiotes de animales (Zooxantelas simbiotes de corales tropicales) y de parasitismo (generalmente alga/alga). (18)

#### **4.3. Factores hidrodinámicos**

Directamente relacionados con los movimientos del agua del mar. Dado lo lenta que es la difusión de las sustancias en el agua se dice que si el agua del mar no estuviese tan agitada la vida en ella sería imposible. En este hidrodinamismo intervienen básicamente las olas y las corrientes, y en algunos sitios, las mareas. (18)



#### **4.4. Temperatura y salinidad**

Temperatura y luz ejercen una compleja influencia sobre el desarrollo de las algas y sobre sus procesos metabólicos y reproductores. Hasta tal punto sucede esto que las diferencias anuales de temperatura y el fotoperíodo son factores definitivos en el desarrollo de ciertas especies y en la presencia o ausencia en ciertos lugares. La oscilación de temperatura en franjas de latitud es responsable de la distribución geográfica. (18)

En cuanto a la salinidad del mar (que oscila en general en torno a un 35 por mil) influye también en todo tipo de procesos vitales de las algas. En los medios con salinidad variable (la salinidad oscila a lo largo del tiempo). Las especies intermareales pueden resistir concentraciones de 3 a 100 partes de sal por mil de agua, mientras que las algas submareales soportan exposiciones breves a concentraciones de 15 a 45 partes por mil. (18)

### **5. Clasificación**

#### **5.1. Diatomeas**

También llamadas bacilariofitas, son un clase de algas pluricelulares, cuyo tamaño oscila entre 2 y 4 milímetros, provistas de una membrana externa impregnada de sílice, denominada frústula, constituida por dos valvas, que encajan entre sí, lo que les da gran consistencia, y que pueden tomar formas muy variadas: alargada, elíptica, esferoidal, cúbica, estrellada, etc. (10)

Viven en agua dulce o salada, especialmente en la última, y menos frecuentemente en tierra húmeda. (13)

Contienen un núcleo y cromatóforos, que llevan como pigmentos clorofilas A y C, carotenos beta y xantofilas, especialmente luteína y ficoxantina, a las que se debe el color pardo o pardo - amarillento característico del alga. (13)

Se multiplican asexualmente por división mitótica o división longitudinal, y también sexualmente cuando alcanzan el tamaño mínimo vital o auxosporulación. La meiosis es gamética, por lo que las diatomeas son diplontes. (13)

Constituyen una parte importante del plancton marino, y gracias a la resistencia de la membrana pueden reconocerse con todo detalle las especies fósiles. (13)

## **5.2. Dinoflagelados**

Corresponden a un grupo del fitoplancton principalmente marino de carácter cosmopolita cuyo tamaño fluctúa entre 20 y 500 $\mu\text{m}$ , por lo que se les ubica dentro del microplancton. Los dinoflagelados son protistas, principalmente planctónicos que se mueven en el agua gracias a dos flagelos desiguales y contienen pigmentos rojo-anaranjados. Muchos de ellos contienen cromatóforos fotosintéticos en el protoplasma y celulosa en la pared tecal, por lo que se parecen a los vegetales. (15)

Sin embargo, otras formas son heterotróficas y por su capacidad de desplazamiento se parecen más a los animales. La mayoría se distinguen por la presencia de un núcleo especial que entre otras características tiene cromosomas fibrilares que se mantienen condensados y visibles durante todo el ciclo mitótico. (15)

Sus características morfológicas y requerimientos nutritivos los hacen exitosos desde el punto de vista reproductivo y de crecimiento en aguas tropicales, donde la estabilidad en la columna de agua es mayor y la concentración de nutrientes más baja, sin embargo, ocupan un lugar secundario respecto de las diatomeas. (15)

El ciclo vital de muchas especies de dinoflagelados presenta dos estadios principales. Uno móvil en el cual la célula está envuelta en una membrana llamada amfiesma y ocasionalmente por una estructura celulósica llamada TECA, la cual no es fosilizable. En el otro estadio, la célula es inmóvil y se encuentra dentro de un QUISTE, el cual en ocasiones está hecho de un material proteínico muy resistente que si es fosilizable. (15)

Para la clasificación pueden ser divididos en dos grandes grupos diferenciados por la presencia o ausencia de placas en su amfiesma, por lo que se les denomina TECADOS o ATECADOS. (15)

### **5.3. Cianobacterias**

Presentan membranas internas llamadas laminillas fotosintetizadoras (lo que las hace autótrofas) dispuestas en un complejo multilaminar, son las responsables de realizar el metabolismo fotosintético ya que poseen clorofila, pigmentos fotosintéticos accesorios, factores ATP sintetasa y en general todo el complejo enzimático. (15)

Las cianobacterias poseen sólo una forma de clorofila, la clorofila a, y todas poseen pigmentos biliprotéicos como las ficobilinas entre las que se encuentra la ficocianina, que participan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis y son responsables del color azulado característico de las mayoría de cianobacterias. (15)

En cuanto a su pared celular no contiene celulosa pero es muy resistente debido a la presencia de polisacáridos unidos a polipéptidos. Además secretan una sustancia mucilaginososa que les confiere la defensa contra predadores ya que puede ser tóxica. Por otra parte un grupo de células formando filamentos (cianobacterias filamentosas). (15)

La reproducción se da por fragmentación de los filamentos dando origen a hormogonios que se separan de los filamentos originales y se mueven deslizándose, además algunas especies forman células especiales con pared exterior engrosada (acinetos) que les permite permanecer latentes cuando las condiciones ambientales son desfavorables (sequía, oscuridad, congelación). Los acinetos se rompen durante la germinación para dar paso a la formación de nuevos filamentos vegetativos. (15)

## **6. Usos de las algas marinas**

### **6.1. En agricultura**

Las algas tienen mejores propiedades que los fertilizantes de granja porque liberan más lentamente el nitrógeno, son ricas en microelementos y no traen semillas de malezas. En las épocas en que las algas salen a la costa en grandes cantidades pueden agregarse al suelo sin secarlas previamente. Como se descomponen rápido deben ser enterradas, ya que al no tener fibras en cantidad comparable a otros vegetales se gelatinizan y no sirven para formar composta. (20)

También pueden añadirse al composta posteriormente, en una proporción de hasta 30 toneladas de algas frescas por hectárea. Se pueden utilizar para elaborar fertilizantes foliares, es decir, extractos con los que se rocían las plantas. (20)

Estos productos, que se comercializan desde 1950, ya sea en forma líquida o como polvos para diluir, tienen propiedades que optimizan el aprovechamiento de los minerales. También se han agregado a las semillas para mejorar su germinación y su crecimiento en las primeras etapas. (20)

## **6.2. Para la nutrición humana**

El uso de algas marinas en la alimentación humana está muy extendido en la zona del Pacífico. Esto ha generado el desarrollo de varias técnicas de cultivo y la creación de una compleja red de comercialización. (12)

Si se remite a los recetarios tradicionales de las comunidades costeras se encuentran antecedentes del uso de algas en la alimentación principalmente en Japón, Corea y China, pero también en Europa, Canadá y Sudamérica. (12)

Actualmente, junto con el desenfrenado uso de aditivos y productos artificiales, entre ellos varios derivados industriales de las algas, se revalorizan algunos productos naturales. Es el caso de aquellos que provienen de las dietas de los pueblos de Oriente, como las algas. (12)

En general las algas que van a ser utilizadas en alimentación son sometidas a procesos de conservación por secado o en envases herméticos (conservas). Solamente en las islas del Pacífico perdura la costumbre de consumir frescas algunas especies por el fácil acceso que tienen a ellas las comunidades humanas litorales. (12)

## **6.3. Para la alimentación animal**

Europa es el continente en el que se utilizan con más frecuencia algas en alimentación animal, especialmente algas pardas. (12)

En la costa de la provincia de Santa Cruz han sido observadas ovejas alimentándose de algas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el alto contenido mineral que poseen, especialmente potasio, sodio y cloro, puede producir trastornos digestivos en los animales. (12)

El agregado de algas parece ser beneficioso para la calidad de la leche y la cantidad de esperma, probablemente por el alto contenido de vitamina E o también por la acción del iodo orgánico sobre la tiroides. (12)

Un campo adicional de utilización de algas en alimentación animal ha sido abierto por el gran desarrollo de la acuicultura. Algunos organismos marinos pueden ser criados en base a alimentación directa con algas frescas. Tal es el caso de los erizos, aprovechados por sus gónadas en Japón y Chile. (12)

#### **6.4. En medicina y cosmética**

Las algas marinas son beneficiosas también en el campo de la farmacia, la medicina y la cosmética. (12)

Unas ochenta especies de algas marinas estarían en uso en Oriente por sus propiedades vermífugas, anticoagulantes y antilipémicas. En Chile, los indígenas de los Andes utilizan algas para combatir el bocio. Aunque un exceso de iodo por consumo exagerado de algas frescas o tabletas de las mismas puede producir un efecto similar al bocio. (12)

Existen algunos indicios acerca de la acción antitumoral que poseen las algas pardas marinas. Son conocidos los efectos beneficiosos de los extractos de algas verdes, rojas y pardas para bajar el colesterol. También se han obtenido resultados positivos para estabilizar la presión sanguínea y se ha verificado su actividad antibiótica y antiviral. (12)

Un aspecto interesante es su capacidad de prevenir el envenenamiento radioactivo. Son bastante difundidas en la actualidad las aplicaciones de las algas en dermatología, como cicatrizantes y antiseborreicas. (12)

### **6.5. En productos industriales**

Como productos industriales de las algas podemos encontrar los alginatos, los carragenanos y los agares. Son coloides comparables con almidones, gomas y gelatinas de otras fuentes. (20)

Los alginatos se obtienen de las algas pardas. Las industrias que consumen mayor cantidad de alginatos son la textil y la papelera. La primera los emplea en la imprimación de colorantes. La segunda los utiliza como aditivo en los adhesivos para cartones corrugados y de los films con que se recubren los papeles de alta calidad. También se utilizan para industrializar camarones, carne, anillos de cebolla y una variedad de comidas semiartificiales en base a pastas homogeneizadas con alginatos de sodio, a las que se dan formas más o menos naturales. Un 5% de los alginatos se usa en la industria farmacéutica y de cosméticos. Son bien tolerados en contacto con la piel, refrescantes, lubricantes y de bajo contenido en lípidos. Además se incorporan en jabones, champús y cremas de afeitar como suavizantes y estabilizantes de las espumas y como hidratantes del cabello. (20)

El carragenano de algas rojas se usa para estabilizar helados y leche chocolatada, en alimentos para lactantes y para mascotas, en comidas instantáneas, dulces y productos de panadería. También en cosméticos, cremas, pastas dentales y lociones. Los efectos buscados a través del agregado de carragenanos son variados. Las cremas dentífricas, por ejemplo, lo incorporan para evitar el secado y extender el período de comercialización en estantería, mientras que las leches en polvo incrementan la cremosidad con su adición. (20)

De agares se producen mundialmente unas 4.500 a 6000 Tm. Un 80% se destina a la industria y un 20% a farmacia y a bacteriología. Según su calidad puede costar entre 10 y 45 dólares el kg y hasta 60 dólares en el caso del agar purificado. La agarosa purificada, en cambio, puede costar entre 535 y 5400 dólares el kg. (20)

### **7. Algas marinas con conocido uso farmacológico**

En las últimas tres décadas el descubrimiento de metabolitos con actividad biológica de las micro y macroalgas se ha incrementado de manera significativa.

Sin embargo, a pesar de la intensa labor de investigación por instituciones académicas y empresariales, muy pocos productos con un potencial real han sido identificados o desarrollados.

En los últimos años las empresas farmacéuticas han empezado a buscar en los organismos marinos, incluyendo las algas marinas, nuevos fármacos a partir de productos naturales. Estos productos también se utilizan cada vez más en la investigación médica y bioquímica. Antes de la década de 1950, las propiedades medicinales de las algas se limitaban a tradicionales remedios. Durante los años 80's y 90's, fueron descubiertas en bacterias marina propiedades farmacológicas (bioactividades). Desde entonces las algas han sido la fuente de aproximadamente 35% del descubrimiento de productos químicos entre 1977-1987, seguido por las esponjas (29%) y cnidarios (22%). El descubrimiento de nuevos productos de algas marinas ha disminuido desde 1995 y la atención se ha centrado ahora en los microorganismos marinos. (21)

### **7.1. Antibióticas, antifúngicas, antivirales y antineoplásicas**

Recientemente, investigaciones químicas llevadas a cabo sobre micro y macroalgas han demostrado que estos organismos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos, con estructuras moleculares únicas, no encontradas en otros organismos. La actividad inhibitoria de estos compuestos no parece estar limitada a algún grupo de alga en particular ya que varias especies han mostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de ciertas bacterias, virus y hongos. (34)

Dentro de las especies de macroalgas con uso farmacéutico identificado en este tiempo se encuentran *Grateloupia doryphora*, *Grateloupia proteus*, *Ahnfeltiopsis durvillaei*, *Prionitis decipiens* (Rhodophyta), *Petalonia fascia* (Phaeophyta) y *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta) las cuales son productoras de sustancias bioactivas con efecto antibacteriano. (34)

*Grateloupia doryphora**Petalonia fascia*

Debido probablemente a que la manipulación y extracción de metabolitos en las macroalgas podría ser más sencilla, fueron ampliamente estudiadas antes que las microalgas. Pero posteriormente las microalgas empezaron a ser objeto de estudio, encontrándose en ellas también componentes de amplia utilidad farmacéutica. (34)

Las microalgas, constituyen una importante fuente de compuestos antivirales. Un Se sabe que aproximadamente 600 especies de cianofitas mostraron que cerca del 10% de los extractos probados tuvieron actividad contra el virus Herpex simplex tipo 2 (VHS-2) y contra el virus de inmunodeficiencia tipo 1 (VIH-1). Entre los compuestos responsables de esta actividad se puede nombrar: a una molécula similar a la clorofila (feofórbido) aislada de *Dunaliella primolecta*, a un sulfolípidio obtenido de *Lyngbya lagerheimii* y a una proteína de bajo peso molecular (cianovirín) aislada de *Nostoc ellipsosporum*. En 1997 un grupo de científicos japoneses aisló de *Spirulina platensis* un polisacárido sulfatado, el calciospirulán que presentó actividad contra el VHS-1 y el VIH-1. La actividad antiviral de esta

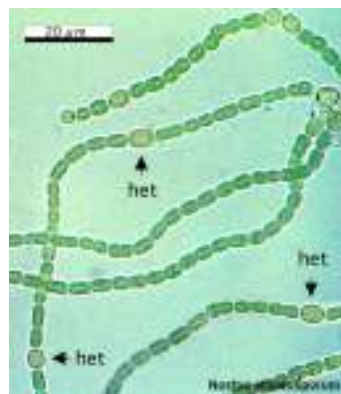


molécula fue comparada con un sulfatodextrano mostrando una actividad superior. El calcio-spirulán inhibe la replicación del virus creando una perturbación en las interacciones iónicas entre las membranas glicoproteicas del virus y los fosfolípidos presentes en las membranas de la célula del huésped, inhibiendo así la fusión celular de ambos. Asimismo, el calcio-spirulán mostró un tiempo de vida media en la sangre de ratón significativamente más largo (150 minutos) que el sulfatodextrano (30 minutos). Los resultados de este estudio son prometedores. El calciospirulán presenta todas las características necesarias de un buen antiviral: no estimula la replicación del virus, tiene actividad a bajas concentraciones, posee elevados tiempos de vida media en la sangre y tiene poca actividad anticoagulante. (34)

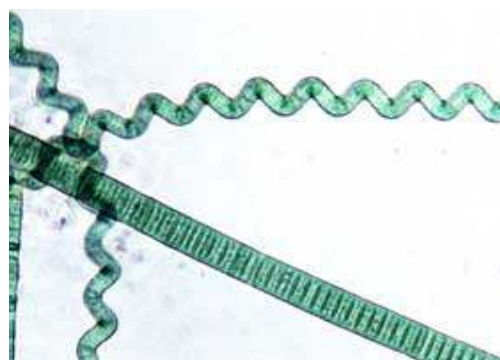
*Dunaliella primolecta*



*Nostoc ellipsosporum*



*Spirulina platensis*



Por otra parte, hace algunos años, se descubrió que algunas especies de microalgas son capaces de producir dos proteínas terapéuticas de uso humano; VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular humano) utilizada para el tratamiento de pacientes que sufren de enfisema pulmonar y HMGB1 (alta proteína de movilidad grupo B1) que activa las células inmunes y está siendo investigada por su potencial para mejorar otras terapias contra el cáncer. (34)

## **7.2. Antioxidantes**

El cuerpo humano está constituido por billones de diminutas células hechas de miles de moléculas que contienen electrones que van por parejas. Aquellas moléculas que poseen electrones sin pareja, son radicales libres. (34)

Es normal tener radicales libres en el cuerpo. Sin embargo, en condiciones de estrés o por la influencia de factores ambientales como radiaciones UV, contaminación, etc., se puede producir una formación de estos radicales libres por encima de los niveles aceptables. La formación excesiva de estas formas provoca la peroxidación de las membranas lipídicas (particularmente los ácidos grasos poliinsaturados), la degradación de las proteínas, azúcares y del ADN. Los radicales libres están involucrados pues en los procesos de envejecimiento prematuro de la piel y en numerosas patologías como el cáncer de piel o la arterioesclerosis. Los radicales libres, pueden ser neutralizados con antioxidantes y éstos se encuentran de forma natural en nuestro cuerpo o entran en él a través de dietas ricas en vegetales. Sin embargo, el estilo de vida actual (estrés medioambiental, malos hábitos en alimentación, etc.) puede causar en nuestro cuerpo una deficiencia de antioxidantes. (34)

Las algas marinas, como organismos fotosintéticos, están expuestas a una combinación de luz y altas concentraciones de oxígeno, lo cual permite la formación de radicales libres y otros agentes oxidantes. Los elementos del aparato fotosintético son especialmente vulnerables al daño fotodinámico ya que los ácidos grasos poliinsaturados son importantes componentes estructurales de la membrana de los tilacoides. La ausencia de tales daños en las algas sugiere, y nos lleva a pensar, que las células de estos organismos marinos deben tener mecanismos y compuestos que previenen y protegen de la oxidación. Efectivamente, las algas

marinas constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes y de enzimas protectoras que permiten luchar contra las especies reactivas del oxígeno formadas a partir de nuestro metabolismo. Estas sustancias antioxidantes son de naturaleza variada y pueden estar aisladas, a partir de extractos lipídicos y acuosos. (34)

Antioxidantes liposolubles:

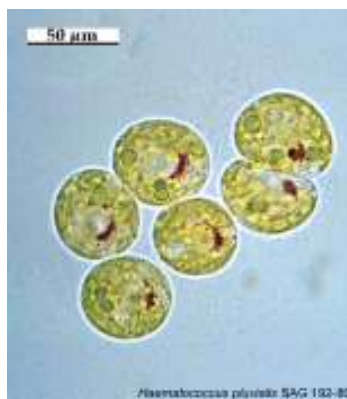
(a) Tocoferol o vitamina E. La presencia de tocoferol en los extractos lipídicos del alga verde *Fucus spp.*, y de las algas pardas *Ascophyllum nodosum* y *Ishige okamurae*, explican el poder antioxidante encontrado en estas especies. La forma  $\beta$  del tocoferol ha sido identificada en *Palmaria palmata* y en *Laminaria digitata* mientras que las formas,  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  han sido aisladas en el orden de las fucales. Hay que añadir que la vitamina E, además de la actividad antioxidante, tiene poder antiinflamatorio. (34)

(b) Carotenoides. Existen dos clases de carotenoides: los carotenos y la familia de las xantofilas, siendo ambos complejas cadenas de hidrocarburos. El alga roja *Laurencia obtusa* posee un contenido en carotenos que la hacen una fuente importante de antioxidantes, al igual la microalga verde *Dunaliella salina* que habita en las salmueras. Esta microalga, en condiciones de alta irradiación y alta temperatura, produce importantes cantidades de  $\beta$ -caroteno, pigmento que le da la característica coloración rojiza y que tiene un alto poder antioxidante. Sin embargo, la astaxantina producida por otra microalga, *Haematococcus pluvialis*, posee una actividad antioxidante diez veces superior a la del  $\beta$ -caroteno producido por *Dunaliella salina*. La astaxantina protege contra los efectos de los rayos UV, generación de manchas y cánceres quimioinducidos, además de estimular las respuesta inmunitarias, reducir la inflamación gástrica y disminuir las enfermedades coronarias y la arterioesclerosis. (34)

*Dunaliella salina*



*Haematococcus pluvialis*



(c) Clorofila y sus derivados. La clorofila a y sus derivados (feofitinas) contenidos en la fracción de los lípidos neutros son capaces de actuar con los radicales peróxidos. La feofitina a y la pirofeofitina a han sido identificados como responsables de la actividad antioxidante del alga verde *Enteromorpha* y del alga parda *Eisenia bicyclis*, respectivamente. Estos compuestos muestran un efecto sinérgico con la vitamina E. (34)

d) Fosfolípidos. El fosfatidil inositol ha sido aislado de la fracción fosfolipídica de las especies *Fucus spp.* y *Ascophyllum nodosum*. Otros fosfolípidos como son el fosfatidil etanolamina, colina y serina aislados de *Eisenia bicyclis* presentaron un efecto antioxidante sinérgico con la vitamina E. (34)

Antioxidantes hidrosolubles:

(a) Polifenoles. Los florotaninos del alga *Chlamydomonas nivalis* y *Eisenia bicyclis* son capaces de bloquear la carcinogénesis producida por la irradiación UV. (34)

(b) Las ficobiliproteínas. Las ficobiliproteínas son los principales pigmentos accesorios colectores de la energía lumínica en las algas rojas y las cianobacterias. La razón principal del poder antioxidante reside en la c-ficocianina que presenta una actividad antiinflamatoria y neuroprotectora. Es por esto que se puede utilizar en enfermedades neurodegenerativas causadas por el estrés oxidativo (Alzheimer, Parkinson), así como para las úlceras gástricas y el cáncer de colon. (34)

(c) Vitamina C o ácido ascórbico. Las algas con un mayor contenido en vitamina C son las que pertenecen al orden de las Fucales (*Fucus spp.*, *Ascophyllum nodosum*).

El ácido ascórbico es producido por fermentación en la microalga *Chlorella pyrenoidosa*. (34)

(d) Enzimas. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la transformación del radical anión superóxido en agua oxigenada. La SOD de la microalga roja *Porphyridium cruentum* está siendo estudiada para ayudar en la terapia contra el SIDA por reducir los efectos del virus y la replicación viral en las personas seropositivas. (34)

*Porphyridium cruentum*



### 7.3. Anticoagulantes

Los anticoagulantes son ampliamente usados en ciertas enfermedades tromboembólicas. Previenen la formación y el depósito de trombos, e inhiben la fabricación de la trombina y la protrombina, que son las enzimas responsables de la coagulación. El primer anticoagulante natural fue encontrado por McLean en el hígado y fue bautizado con el nombre de heparina por Howell y Holt en 1918. La heparina ha sido usada ampliamente en medicina y químicamente se define como un polisacárido en el cual los grupos O-sulfato y el N-sulfato forman parte del esqueleto de carbohidratos. Los polisacáridos contenidos en la pared celular de las algas difieren de los de la heparina en que no contienen grupos N-sulfato en su molécula. Sin embargo, una de las características principales de algunos polisacáridos algales es precisamente el contenido de grupos O-sulfato, característica que no es propia de los polisacáridos de la pared celular de plantas terrestres. (34)

Entre estos polisacáridos encontramos el carragenato, polisacárido que se extrae de algunos géneros de algas rojas. El carragenato contiene entre un 22 y 35 % de grupos sulfato. En base a la cantidad de estos grupos y su ubicación dentro de la molécula el carragenato se clasifica en tres tipos:  $\iota, \kappa, \lambda$ . En 1977, Vargaftig revisó la actividad anticoagulante de todos estos tipos de carragenatos y encontró que el

carragenato  $\lambda$  es el que presentaba la mayor actividad antitrombica, debido probablemente al mayor contenido de sulfatos en su molécula en comparación con los otros dos tipos de carragenato. Similares resultados se obtuvieron en 1984 con el  $\lambda$ -carragenato de las algas *Phyllophora brodiaei* y *Grateloupia dichotoma*. (34)

Otro polisacárido que ha mostrado actividad anticoagulante es el fucoidán o fucano, propio de las algas pardas, formado por L-fucosa monosulfato. Algunos autores fraccionaron el fucoidán con etanol a varias concentraciones y obtuvieron siete fracciones, las cuales mostraron una actividad anticoagulante correspondiente a un 60 y 80 % de la actividad de la heparina en la sangre humana. *Durvillaea antarctica* es un alga parda intermareal que habita en las costas chilenas y es de especial importancia pues es explotada comercialmente como fuente de alginato, goma usada como aditivo alimenticio. Además de eso, esta especie posee importantes cantidades de polisacáridos sulfatados por lo que ha sido seleccionada para probar la actividad anticoagulante. (34)

La hidrólisis total del polisacárido de *Durvillaea antarctica* mostró una estructura heterogénea donde el principal azúcar mayoritario es la fucosa y donde las proporciones fueron: 55.8% de carbohidratos, 23.5% de sulfatos, 4.22% de ácidos urónicos y 0.14% de proteínas. Por otro lado, estudios muy recientes llevados a cabo en el Instituto Francés de Investigación y Explotación del Mar (IFREMER) han mostrado al alga parda *Ascophyllum nodosum* como una especie prometedora para combatir la trombosis. Nuevamente, el fucano es el agente activo. Menos atención han recibido las algas verdes en cuanto a sus propiedades anticoagulantes. Sin embargo, existe en la literatura un trabajo reciente sobre la inhibición de los mecanismos de coagulación de los polisacáridos sulfatados y de un proteoglicano encontrados en el alga verde *Codium fragile*. Este proteoglicano contiene un 8.6% de proteína y un 18.4% de sulfatos. Los otros dos polisacáridos obtenidos por cromatografía contienen respectivamente 7.7 y 10.2% de grupos sulfato. En este trabajo se muestra que los polisacáridos inhiben la acción de la trombina y que esta inhibición es directamente proporcional al peso molecular y al contenido de sulfatos del polisacárido. Por otro lado, el proteoglicano inhibe la trombina de forma indirecta, activando otra enzima inhibitoria de la trombina. (34)

Las algas marinas se presentan como fuentes alternativas, directa o indirectamente, de compuestos con propiedades anticoagulantes y antitrombóticas, con propiedades comparables con la actividad de la heparina, pero sin el riesgo de posibles alergias debidas a contaminación en la fase de aislamiento, como suele suceder con los anticoagulantes de origen animal. (34)

#### **7.4. Otros usos terapéuticos**

Las propiedades mencionadas anteriormente (antibacteriana, antiviral, antioxidante, antineoplásica y anticoagulante) no constituyen las únicas aportaciones a la salud que proporcionan las algas marinas. Un gran número de especies, como por ejemplo las algas verdes *Enteromorpha compressa* y *Ulva pertusa*, las algas pardas *Sargassum muticum*, *Fucus gardneri* y las algas rojas *Chondrus* y *Porphyra*, contienen esteroides (ergosterol, chondriosterol, fucoseterol, etc.) que poseen actividad hipocolesterolemica. Esta misma actividad se encuentra en algunos polisacáridos algales (alginato de sodio, fucoidán y carragenato) que son capaces de disminuir el colesterol en la sangre debido a que son polisacáridos acidificados que actúan como fibra dietética. Otras especies han mostrado tener actividad hipoglicémica, como es el caso del alga *Corallina rubens*, cuyo extractos disminuyeron el contenido de azúcar desde 110 a 85 mg en un tiempo de 120 minutos, comparado con la actividad de la insulina cuya disminución fue desde 100 a 75 mg en el mismo tiempo. (34)

Dentro de los últimos avances en la investigación como de industrialización, que se están llevando a cabo sobre el uso de las algas en medicina, se pueden mencionar; extractos del alga parda *Padina pavonica* que están siendo utilizados para tratar enfermedades de los huesos por su elevada capacidad para fijar el calcio en los tejidos biológicos. El alginato de sodio, a su vez (transformado en alginato de calcio in situ), es usado para evitar la adherencia entre tejidos después de una intervención quirúrgica. El material formado es biocompatible y se degrada con el tiempo, sin necesidad de una intervención quirúrgica para eliminarlo. (34)

#### IV. JUSTIFICACION

El estudio científico de las microalgas comenzó en 1890, cuando el microbiólogo holandés Biejelinçk estableció cultivos puros de microalgas de agua dulce, en 1919 Otto Warburg en Londres consiguió cultivos densos en el laboratorio, e introdujo la idea de utilizar estos cultivos como una herramienta de trabajo en el estudio de la fotosíntesis. El concepto de producción masiva de microalgas se llevó a cabo por primera vez en Alemania durante la II Guerra mundial, dirigido a la producción de lípidos para su uso como fuente de combustible y comenzó a considerarse la biomasa microalgal como un suplemento importante, incluso, capaz de reemplazar las proteínas animales o vegetales convencionales para consumo directo del ganado o del hombre. En Estados Unidos de Norteamérica durante los años 60 se desarrollaron sistemas cerrados de cultivo de microalgas para utilizar en misiones espaciales y en la década de los 80 se establecen ya numerosas industrias para la producción de microalgas, pronto considerada como una de las más prometedoras, por sus propiedades terapéuticas. (16)

No obstante, aunque el potencial de los bioproductos es enorme en el contexto actual, en Guatemala, no se han elaborado estudios que permitan sentar un precedente, para que con ello se de inicio a la experimentación y la investigación de los diferentes componentes y metabolitos presentes en las microalgas.

Por ello el objetivo de esta investigación es identificar, aislar y purificar las cepas de microalgas nativas del litoral Atlántico de Guatemala, para proveer de un cepario actualizado de microalgas nativas del litoral atlántico del país, a disposición de la comunidad científica, para que se pueda explotar este recurso y que los resultados de estas investigaciones puedan constituir avances en el campo farmacéutico.



## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo General

1.1. Identificar, aislar y purificar las cepas de microalgas nativas que crecen a poca profundidad en el litoral Atlántico de Guatemala.

### 2. Objetivos Específicos

2.1. Identificar microalgas en gotas de agua tomadas de muestras del litoral atlántico de Guatemala.

2.2. Realizar una descripción de las características de las algas marinas microscópicas del litoral atlántico de Guatemala.

2.3. Revisar las cepas de microalgas aisladas, sugerir el posible potencial farmacéutico que puede representar cada una de ellas.

2.4. Proveer de un cepario actualizado de algas, a disposición de la comunidad científica.

2.5. Conseguir por medio de la micromanipulación el aislamiento y purificación de las cepas de microalgas identificadas en cada muestra.

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 1. Universo de Trabajo

Microalgas nativas del litoral Atlántico de Guatemala.

Muestra: Algas microscópicas que crezcan en los agares, para luego aislarlas, purificarlas e identificarlas.

### 2. Materiales

#### 2.1. Cristalería y Equipo

- |   |                               |
|---|-------------------------------|
| 2.1.1. Portaobjetos                             | 2.1.14. Tubos de ensayo kimax |
| 2.1.2. Cubreobjetos                             | c/tapón de rosca,             |
| 2.1.3. Frascos ambar de 60 ml con gotero        | 2.1.15. Erlenmeyer, 250ml     |
| 2.1.4. Micogoteros                              | 2.1.16. Erlenmeyer, 1000ml    |
| 2.1.5. Estufa con agitador magnético            | 2.1.17. Beaker, 50ml          |
| 2.1.6. Pipeta graduada 01ml (0.01), clase b     | 2.1.18. Beaker, 0600ml        |
| 2.1.7. Pipeta graduada 02ml (0.01), clase b     | 2.1.19. Beaker, 1000ml        |
| 2.1.8. Pipeta graduada 05ml (0.1), clase b      | 2.1.20. Asa de Nicromo        |
| 2.1.9. Pipeta graduada 25ml (0.1), clase b      | 2.1.21. Microscopio binocular |
| 2.1.10. Balón aforado 100ml, clase bc/tapón     | invertido                     |
| 2.1.11. Balón aforado 250ml, clase bc/tapón     | 2.1.22. Centrifuga            |
| 2.1.12. Balón aforado 1000ml, clase ac/tapón    | 2.1.23. Mechero de busen      |
| 2.1.13. Caja de petri poliestireno de 100x15 mm |                               |

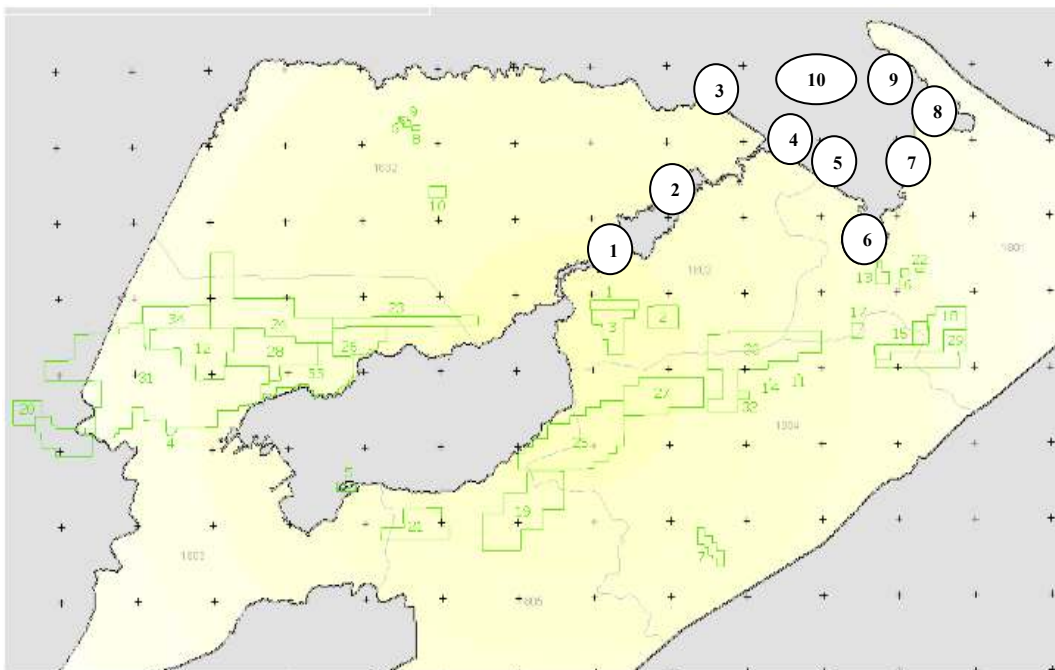
#### 2.2. Reactivos

- 2.2.1. Nitrato de sodio
- 2.2.2. Sodio dihidrogenofosfato monohidrato
- 2.2.3. Sodio silicato en solución
- 2.2.4. Hierro(iii) cloruro en solución (15% fe)
- 2.2.5. Cobalto (ii) cloruro hexahidratado
- 2.2.6. Cobre(ii) sulfato pentahidratopa
- 2.2.7. Sodio molibdato dihidrato
- 2.2.8. Cinc sulfato heptahidrato usp,
- 2.2.9. Manganeso(ii) cloruro terahidrato
- 2.2.10. Eter de petróleo intervalo de ebullición 50-70 grad c

### 3. Metodología

#### 3.1. Muestreo

La toma de muestras se realizó en el litoral atlántico del país. En este mapa se observan los puntos muestreados en el litoral Atlántico de Guatemala, los puntos 1 y 2 se tomaron en el río dulce, los puntos 3 al 9 en todo el litoral, desde la frontera con Belice pasando por Puerto Barrios hasta llegar a punta de manabique, y el punto 10 que se tomo al centro de la bahía.

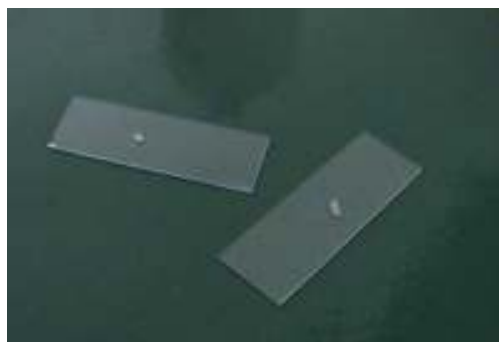


Para su recolección se utilizó una red de fitoplancton. Gran parte de las muestras fueron transportadas en hieleras debido a que la temperatura baja permite disminuir la actividad biológica de las microalgas y esto consigue evitar que mueran por estrés o que el fitoplancton se alimente de ellas, las muestras restantes fueron fijadas con lugol en el lugar de muestreo para preservarlas y poder identificarlas posteriormente con facilidad.

#### 3.2. Identificación

Se llevó a cabo a partir de una muestra centrifugada del agua recolectada en siete diferentes puntos del litoral atlántico de Guatemala, a una profundidad superficial. Se toma una gota de agua y se coloca entre un porta y cubre objetos, para ser observada posteriormente en el microscopio invertido.

Se analizó minuciosamente cada muestra para identificar las microalgas por medio de comparación por fotografías y utilización de claves dicotómicas reportadas en la bibliografía, identificando características morfológicas para así determinar el género y la especie de las diferentes microalgas observadas microscópicamente en las muestras. (1, 21)



### 3.3. Aislamiento

Una vez identificadas las microalgas en las muestras, se aislaron, utilizando como método la micromanipulación. Con la ayuda de un microscopio invertido, se montaron muestras en un portaobjetos, con un capilar adelgazado se tomaron las células de las microalgas previamente identificadas y se inocularon en tubos de ensayo con medio f/2 (ver anexo no. 1). (1)



### **3.4. Purificación**

Al apreciar crecimientos macroscópicos en los tubos inoculados en el paso anterior, se observaron en el microscopio invertido, si se encontraba más de una cepa de microalgas en el mismo tubo, se procedió a separarlas en tubos diferentes, por medio de la micromanipulación de nuevo, para poder obtener así cultivos puros de los especímenes aislados. (1)

Toda la cristalería utilizada, durante el proceso se esterilizó con autoclave, para evitar la contaminación de las muestras y que esto dificultara en algún punto su identificación, aislamiento y purificación. (1)

### **3.5. Revisión**



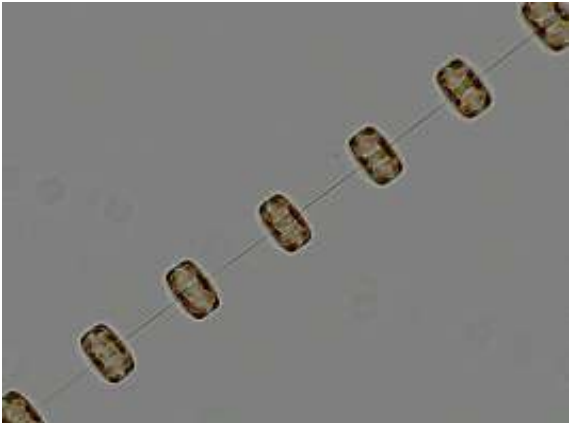
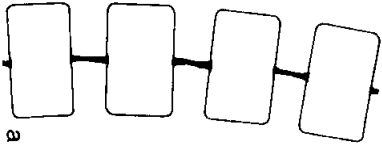
Se revisaron las especies de microalgas aisladas en; fuentes bibliográficas y revistas científicas, para poder así, sugerir un posible potencial farmacéutico y/o cosmético, para su posterior investigación en otros trabajos de tesis.


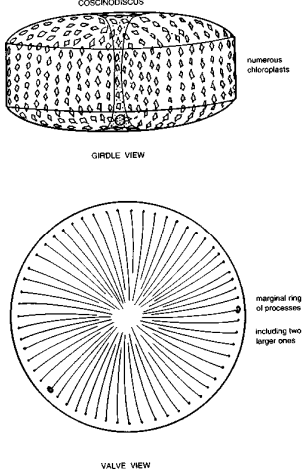


## VII. RESULTADOS


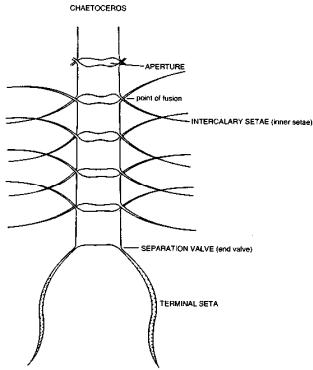
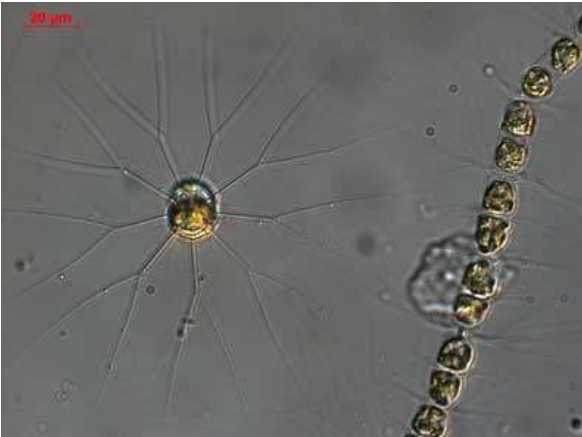
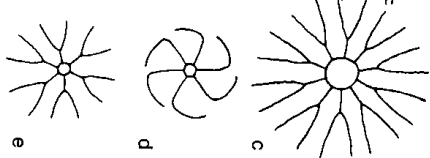
### 1. Identificación

Utilizando un microscopio invertido, se llevó a cabo una observación minuciosa de gotas de agua tomadas de diferentes muestras adquiridas en varios puntos de muestreo, en el litoral atlántico de Guatemala. Identificando una amplia diversidad de microalgas.

TABLA No.: 1


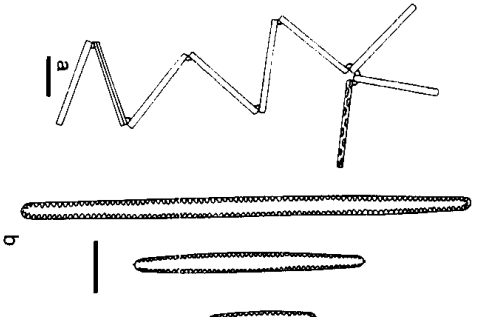

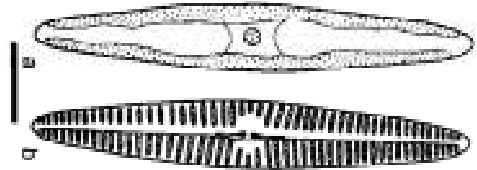
Especie Identificada	Descripción
<p data-bbox="400 689 564 723" style="text-align: center;"><i>Melosira sp.</i></p> 	<p data-bbox="831 636 1082 669">Diatomea: Céntrica</p> <p data-bbox="831 689 1107 723">Orden: Biddulphiales</p> <p data-bbox="831 743 1174 777">Suborden: Coscinodisneae</p> <p data-bbox="831 797 1118 831">Familia: Melosiraceae</p> <p data-bbox="831 851 1059 884">Género: <i>Melosira</i></p> <p data-bbox="831 904 1469 1055">Células con forma cilíndrica, un poco más largas que anchas, adheridas unas a otras por la superficie valvar con mucilago. (21)</p> <p data-bbox="831 1075 1469 1160">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3.</p> 
<p data-bbox="371 1350 593 1384" style="text-align: center;"><i>Thalassiosira sp.</i></p> 	<p data-bbox="831 1296 1082 1330">Diatomea: Céntrica</p> <p data-bbox="831 1350 1107 1384">Orden: Biddulphiales</p> <p data-bbox="831 1404 1174 1438">Suborden: Coscinodisneae</p> <p data-bbox="831 1458 1174 1491">Familia: Thalassiosiraceae</p> <p data-bbox="831 1512 1118 1545">Género: <i>Thalassiosira</i></p> <p data-bbox="831 1565 1469 1715">Células en cadenas unidas por mucílago. Tienen forma de tambor, valvas redondeadas con una hilera de pequeñas espinas en el margen.</p> <p data-bbox="831 1736 1469 1821">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3.</p>  <p data-bbox="1426 1872 1449 2002" style="text-align: right;"><i>Thalassiosira</i></p>

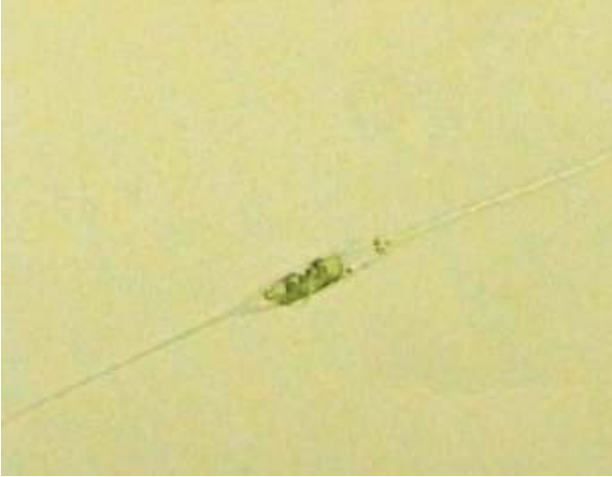





Especie Identificada	Descripción
<p data-bbox="347 416 584 450"><i>Coscinodiscus sp.</i></p> 	<p data-bbox="815 248 1066 282">Diatomea: Céntrica</p> <p data-bbox="815 304 1091 338">Orden: Biddulphiales</p> <p data-bbox="815 360 1158 394">Suborden: Coscinodisneae</p> <p data-bbox="815 416 1158 450">Familia: Coscinodiscaceae</p> <p data-bbox="815 472 1114 506">Género: <i>Coscinodiscus</i></p> <p data-bbox="815 528 1469 775">Células en forma de disco, que se observan usualmente solitarias, con aréolas en línea recta, ligeramente más pequeñas cerca del margen. Valva ligeramente estriada, espínulas marginales presentes. (21)</p> <p data-bbox="815 797 1469 887">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3 y 4.</p> 
<p data-bbox="355 1406 576 1440"><i>Rhizosolenia sp.</i></p> 	<p data-bbox="815 1352 1066 1386">Diatomea: Céntrica</p> <p data-bbox="815 1408 1091 1442">Orden: Biddulphiales</p> <p data-bbox="815 1464 1179 1498">Suborden: Rhizosoleniineae</p> <p data-bbox="815 1520 1158 1554">Familia: Rhizosoleniaceae</p> <p data-bbox="815 1576 1094 1610">Género: <i>Rhizosolenia</i></p> <p data-bbox="815 1632 1469 1778">Células cilíndricas, con una simetría valvar unipolar, contienen numerosos y pequeños cloroplastos.</p> <p data-bbox="815 1800 1469 1890">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3, 4 y 9.</p> 


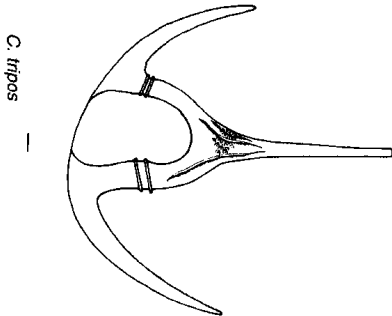

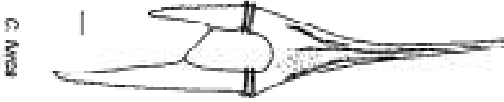
Especie Identificada	Descripción
<p style="text-align: center;"><i>Chaetocero sp.</i></p> 	<p>Diatomea: Céntrica          Orden: Biddulphiales          Suborden: Biddulphiineae          Familia: Chaetoceroaceae          Género: <i>Chaetocero</i></p> <p>Células que poseen valvas con apéndices largos, se encuentran solitarias o en cadenas, unidas por sílice, generalmente con dos apéndices por valva. (21)</p> <p>Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 2 y 3.</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Bacteriastrum sp.</i></p> 	<p>Diatomea: Céntrica          Orden: Biddulphiales          Suborden: Biddulphiineae          Familia: Chaetoceroaceae          Género: <i>Bacteriastrum</i></p> <p>Células cilíndricas unidas por la fusión de numerosas setas que son regularmente dispuestas alrededor del borde de la célula. Las células tienen numerosos cloroplastos pequeños y redondos. Las setas, son de diferentes formas (ramificado, dividido, curvos).</p> <p>Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 1 y 2.</p> 



Especie Identificada	Descripción
<p style="text-align: center;"><i>Odontella aurita</i></p> 	<p>Diatomea: Céntrica          Orden: Biddulphiales          Suborden: Biddulphiineae          Familia: Eupodiscaceae          Género: <i>Odontella</i></p> <p>Células oblongas a rectangulares. Elevaciones polares divergentes, bastante largas y más anchas en la base, por las que se unen formando Cadenas rectas o en zig zag. Valvas elípticas-lanceoladas a casi circulares, convexas en el centro de donde surgen dos procesos tubulares divergentes. Cara valvar lisa o con finos granos. (21)</p> <p>Distribución geográfica: presente en todos los puntos de muestreo.</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Odontella longicruris</i></p> 	<p>Diatomea: Céntrica          Orden: Biddulphiales          Suborden: Biddulphiineae          Familia: Eupodiscaceae          Género: <i>Odontella</i></p> <p>Células que se pueden encontrar solitarias o formando cadenas rectas. Tienen valvas con elevaciones en forma de cuerno en los polos y numerosos cloroplastos pequeños.</p> <p>Distribución geográfica: presente en todos los puntos de muestreo.</p> 

Especie Identificada	Descripción
<p data-bbox="344 356 592 394" style="text-align: center;"><i>Thalassionema sp.</i></p> 	<p data-bbox="815 248 1054 282">Diatomea: Penada</p> <p data-bbox="815 304 1078 338">Orden: Bacillariales</p> <p data-bbox="815 360 1139 394">Suborden: Fragilariineae</p> <p data-bbox="815 416 1209 450">Familia: Thalassionemataceae</p> <p data-bbox="815 472 1126 506">Género: <i>Thalassionema</i></p> <p data-bbox="815 528 1469 730">Células que se pueden encontrar solitarias o en colonias de varios tipos formando estrellas, zigzag o aros. Las células se observan rectangulares. (21)</p> <p data-bbox="815 752 1469 842">Distribución geográfica: presente en todos los puntos de muestreo.</p> 
<p data-bbox="384 1296 552 1335" style="text-align: center;"><i>Navicula sp.</i></p> 	<p data-bbox="815 1240 1054 1274">Diatomea: Penada</p> <p data-bbox="815 1296 1078 1330">Orden: Bacillariales</p> <p data-bbox="815 1352 1139 1386">Suborden: Bacillariineae</p> <p data-bbox="815 1408 1110 1442">Familia: Naviculaceae</p> <p data-bbox="815 1464 1046 1498">Género: <i>Navicula</i></p> <p data-bbox="815 1520 1469 1834">Incluye individuos con valvas lanceoladas, estriadas transversalmente en la zona media, en sentido opuesto a los polos. Los extremos de las células son redondeados. Pueden o no encontrarse en cadenas. (21) Distribución geográfica: presente en todos los puntos de muestreo.</p> 

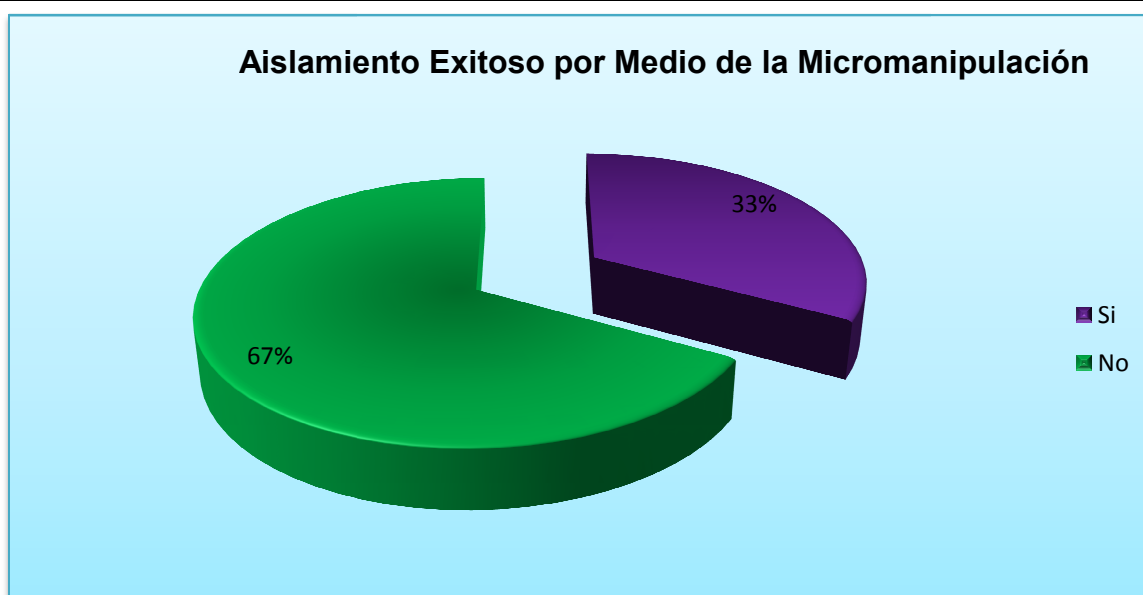
Especie Identificada	Descripción
<p data-bbox="333 356 612 394"><i>Nitzschia longissima</i></p> 	<p data-bbox="828 304 1066 336">Diatomea: Penada</p> <p data-bbox="828 360 1086 392">Orden: Bacillariales</p> <p data-bbox="828 416 1150 448">Suborden: Bacillariineae</p> <p data-bbox="828 472 1126 504">Familia: Bacillariaceae</p> <p data-bbox="828 528 1059 560">Género: <i>Nitzschia</i></p> <p data-bbox="828 584 1469 672">Célula de valvas lineales o lanceoladas, con estrías transversas. (21)</p> <p data-bbox="828 696 1469 784">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 8 y 9.</p> 
<p data-bbox="333 1016 612 1055"><i>Ceratium trichoceros</i></p> 	<p data-bbox="828 965 1011 996">Dinoflagelado</p> <p data-bbox="828 1021 1094 1052">Familia: Ceratiaceae</p> <p data-bbox="828 1077 1059 1108">Género: <i>Ceratium</i></p> <p data-bbox="828 1133 1469 1220">Célula de cuerpo triangular, posee dos cuernos largos de igual tamaño. (21)</p> <p data-bbox="828 1245 1469 1332">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 10.</p> 
<p data-bbox="368 1568 576 1606"><i>Ceratium fusus</i></p> 	<p data-bbox="828 1516 1011 1547">Dinoflagelado</p> <p data-bbox="828 1572 1094 1603">Familia: Ceratiaceae</p> <p data-bbox="828 1628 1059 1659">Género: <i>Ceratium</i></p> <p data-bbox="828 1684 1469 1771">Células fusiformes con un cuerno apical, el lado derecho se encuentra ligeramente curvado. (21)</p> <p data-bbox="828 1796 1469 1883">Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 10.</p> 

Especie Identificada	Descripción
<p style="text-align: center;"><i>Ceratium tripos</i></p> 	<p>Dinoflagelado          Familia: Ceratiaceae          Género: <i>Ceratium</i>          Célula con un cuerpo triangular, Posee dos cuernos, pequeños y menos curvos. (21)          Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3 y 4.</p> 
<p style="text-align: center;"><i>Ceratium furca</i></p> 	<p>Dinoflagelado          Familia: Ceratiaceae          Género: <i>Ceratium</i>          Se puede encontrar solitaria o en pares. Poseen dos cuernos desiguales o ligeramente divergentes. El cuerno derecho es usualmente más pequeño que el izquierdo. (21)          Distribución geográfica: abundante en punto de muestreo no. 3 y 4.</p> 

## 2. Aislamiento

Usando la micromanipulación como herramienta, se aislaron varias especies de microalgas, ya antes identificadas. TABLA No.: 2

Especie Identificada	Aislamiento exitoso por medio de la micromanipulación	
	Si	No
<i>Melosira sp.</i>	X	
<i>Thalassiosira sp.</i>		X
<i>Coscinodiscus sp.</i>	X	
<i>Rhizosolenia sp.</i>		X
<i>Chaetocero sp.</i>		X
<i>Bacteriastrum sp.</i>		X
<i>Odontella aurita</i>	X	
<i>Odontella longicruris</i>	X	
<i>Thalassionema sp.</i>		X
<i>Navicula sp.</i>	X	
<i>Nitzschia longissima</i>		X
<i>Ceratium trichoceros</i>		X
<i>Ceratium fusus</i>		X
<i>Ceratium tripos</i>		X
<i>Ceratium furca</i>		X

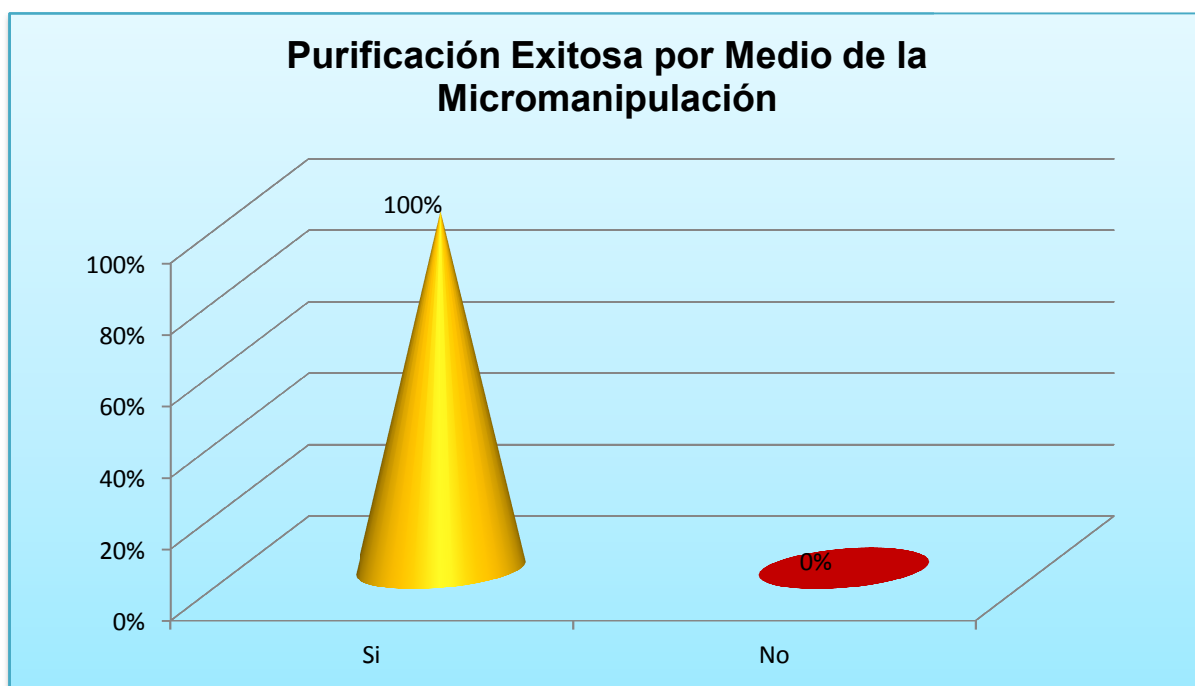


### 3. Purificación

A partir de los cultivos de microalgas aisladas, se purificaron los especímenes, también utilizando la micromanipulación.

TABLA. No. 3

Especie Identificada	Purificación exitosa por medio de la micromanipulación	
	Si	No
<i>Melosira sp.</i>	X	
<i>Coscinodiscus sp.</i>	X	
<i>Odontella aurita</i>	X	
<i>Odontella longicuris</i>	X	
<i>Navicula sp.</i>	X	



#### 4. Revisión

La revisión se hizo sobre las especies que fueron purificadas con éxito.

TABLA No. 4

<b>Especie Identificada</b>	<b>Actividad / Química</b>
<i>Melosira sp.</i>	No se encontraron estudios reportados, acerca de su uso específico en la industria farmacéutica ni cosmética.
<i>Coscinodiscus sp.</i>	Posee poli-beta-1-4-N-acetilglucosamina (p-GlcNAc), polisacárido que solo o en combinación a sido sujeto a investigación como antihipercolesterolemiante, antihiperlipidémico y para usarse en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades proliferativas. (24, 25)
<i>Odontella aurita</i>	Posee una fracción de 5 $\alpha$ , 8 $\alpha$ -epidioxiesteros, éstos han mostrado tener actividad antiparasitaria contra Leishmania. (22)
<i>Odontella longicruris</i>	Es una fuente natural de ácidos grasos poliinsaturados del tipo omega-3 como el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, se compone también de silicio, vitaminas (B2, B6, C, E, PP), de provitamina A, 17 aminoácidos y muchos minerales y oligoelementos. (22)
<i>Navicula sp.</i>	No se encontraron estudios reportados, acerca de su uso específico en la industria farmacéutica ni cosmética.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La búsqueda de nuevos productos naturales con potencial farmacológico ha aumentado debido a que se han extendido las investigaciones con el fin de aislar un mayor número de compuestos que puedan combatir una gran variedad de enfermedades y que sirvan como base para la síntesis de nuevos fármacos.

Este estudio nace a partir de la necesidad de ampliar los horizontes de investigación en el país. Guatemala está lleno de recursos naturales desaprovechados y hasta cierto punto, ignorados por muchos. Todos los grandes descubrimientos iniciaron en pequeños ensayos, para iniciar un estudio de grandes dimensiones es necesario comenzar por lo básico identificando la materia prima, en este caso las microalgas nativas del litoral atlántico del país.

Las microalgas son microscópicas y unicelulares pero pueden florecer y ser observadas a simple vista por la forma de presentarse como geles, mucílagos, manto ó conglomerados, determinadas por las condiciones físicas y químicas del cultivo, regidas fundamentalmente por el mayor nutriente y además por el tiempo de residencia de la masa de agua y del rango o tasa de transferencia de los elementos entre la masa de agua, y el tiempo de transferencia de los elementos.

Para su identificación precisa, se tomaron muestras de agua en el litoral atlántico de Guatemala, de las cuáles se conservaron algunas frescas transportándose en hieleras y otras se fijaron en el lugar con lugol, para no perder detalle alguno en la observación.

Ya en el laboratorio, utilizando como herramienta un microscopio, se observaron minuciosamente las muestras, tanto las frescas como las fijadas, encontrándose diversidad de vida en ellas, incluyendo bacterias, parásitos y por supuesto una amplia variedad de algas microscópicas, al principio su identificación en fresco fue difícil debido a la contaminación presente, como pequeños insectos, tierra y muchos residuos orgánicos, por lo que fue necesario utilizar entonces un microscópico invertido, que otorgo la facilidad de utilizar capilares adelgazados como pequeñas pinzas, para apartar la contaminación y mejorar el campo visual.



Es así como entonces con ayuda de bibliografía actualizada, donde además de basarse en los dibujos detallados, se compararon sus características morfológicas, que pueden determinar por mínimas diferencias su identidad, se identificaron con éxito quince diferentes especies, predominando las diatomeas sobre los dinoflagelados, siendo de las quince especies once diatomeas y solo cuatro dinoflagelados. Todas las cepas identificadas fueron fotografiadas, clasificadas por familia y género, y descritas con sus características más distintivas, para obtener así un cepario de las algas encontradas en las muestras analizadas, el cuál sea útil como referencia. (Ver tabla no. 1)

Una vez identificadas las especies, se inocularon en frascos de 500 ml, que contenían medio nutritivo apropiado, (medio f/2, ver anexo no. 1), los frascos fueron conectados a una bomba que por medio de mangueras proveyeron aeración constante y se colocaron en estanterías con luz directa, ambos factores favorecieron la rápida multiplicación de algunas especies. Durante este proceso se analizó bajo microscopio la multiplicación de las algas.

No todas las especies resistieron, para este momento ya todos los dinoflagelados que se encontraban aparecían sin vida, y solo se podían observar sus esqueletos de sílice, mientras que todas las diatomeas se reproducían a gran velocidad y sin ningún inconveniente.

A partir de los inoculos, se comenzó el aislamiento, utilizando como método la micromanipulación, siempre con la ayuda del microscopio invertido, que permite accesibilidad a la muestra para su manejo, se montaron gotas de los cultivos en portaobjetos sin cubreobjetos, y utilizando un capilar adelgazado con calor, mientras se observaba la muestras se tomaban células o cadenas de células de las cepas identificadas para inocularlas en tubos de 20 ml que contenían también medio f/2. Se tuvo como dificultad principal la misma que en la identificación; la presencia de contaminantes orgánicos, que como en el paso anterior también se apartaron de la mejor forma utilizando otros capilares totalmente sellados para evitar tomar una muestra no deseada.

Las especies que se lograron aislar con éxito de las quince fueron solamente cinco de ellas (Ver tabla no. 2), esto primero porque como ya se mencionó con anterioridad ningún dinoflagelado logró resistir hasta esta fase, y segundo porque las demás

diatomeas que no se aislaron con éxito resultaron ser muy frágiles, y las células se rompían al momento de manipularlas con el capilar, aunque se intentó que este instrumento tuviera la punta redondeada y no aserrada, no siempre se consiguió y esto provocó el falló en este paso.

Cuando se tuvieron los tubos con las especies aisladas, se les permitió de nuevo reproducirse, para poder pasar a la purificación de especies. Al igual que los frascos fueron expuestos a luz continua para favorecer el cultivo. Al poco tiempo se comenzaron a observar masas macroscópicas, de diferentes colores y texturas, algunos eran mucilagos verdes y otros parecían hilos enmadejados de color café. Al observarse al microscopio, se pudieron ver las cepas aisladas, que se habían reproducido con tal éxito, que formaban colonias macroscópicas, pero aun con presencia de algunos contaminantes o bien mezcladas con otras cepas, sobre todo se existía la presencia de *Navicula sp.* en todos los tubos, además de algunas bacterias.

En este momento se comenzó la purificación; de cada tubo aislado, también por medio de la micromanipulación, se tomaron de nuevo células, intentando apartar los pocos contaminantes que aun quedaban, y se inocularon en tubos nuevos. Lo más difícil fue separa las cepas de la *Naviula sp.* pues por ser la de menor tamaño tendía a adherirse a las células de otras especies. Por lo que el proceso se repitió varias veces, hasta obtener cinco cepas puras. (Ver tabla no. 3) Las bacterias sin embargo seguían apareciendo en todos los tubos inoculados, pero no se consideraron como interferentes en este estudio, pues no representaban una parte significativa del cultivo.

Por último, tomando como base estas cinco cepas puras se realizó una revisión en bibliografía y revistas científicas, para encontrar estudios que se hubiesen hecho tanto en Guatemala como en otros países, que sugirieran el potencial para su uso en la industria farmacéutica ó cosmética. (Ver tabla no. 4)

De estas cinco especies se encontró que; el género *Odontella* ha sido ampliamente estudiado en otros países, para su uso en el tratamiento de la leishmaniasis y como fuente natural de ácidos grasos omega-3, tanto así que existen ya en el mercado cápsulas, cuyo principio activo es la microalga *Odontella aurita*. (Ver tabla no. 4)

El género *Coscinodiscus*, es el segundo más estudiado, pues se le atribuyen efectos antihipercolesterolemiantes, antihiperlipidémicos y se cree que puede usarse en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades proliferativas. (Ver tabla no. 4)

De los géneros *Melosira* y *Navicula*, no se encontraron estudios, que validen su potencial farmacológico. Cabe mencionar que ninguno de los artículos, ni la información encontrada; es reportada de Guatemala, sino de otros países.

Es por eso que al final de esta investigación se hace importante mencionar, que por lo menos cinco especies de microalgas nativas del litoral atlántico del país, fueron identificadas, aisladas y purificadas con gran éxito, fueron resistentes y se reprodujeron sin inconvenientes, y por lo tanto son sujetos idóneos, para su investigación individual posterior, con el fin de sugerir su potencial farmacológico o cosmético y brindar herramientas que permitan explotar de forma racional e inteligente los recursos naturales de Guatemala.

## IX. CONCLUSIONES

1. Se identificaron a nivel de género y especie, con ayuda de bibliografía actualizada, quince diferentes especies de microalgas nativas del litoral atlántico de Guatemala.
2. Se hizo un cepario con las quince especies identificadas en las muestras, detallando características para su identificación en estudios posteriores.
3. La micromanipulación como método de aislamiento resultó ser efectivo al momento de trabajar con ciertas especies de diatomeas, incluyendo; *Navicula*, *Melosira*, *Odontella* y *Coscinodiscus*, pero no para aislar dinoflagelados ni otras diatomeas más frágiles.
4. La revisión bibliográfica de las cinco especies aisladas y purificadas con éxito, reveló que existen pocos estudios y artículos científicos que sugieren su utilidad en la industria farmacéutica y cosmética, además todos ellos efectuados fuera del país.

## X. RECOMENDACIONES

1. Realizar muestreos en el litoral Atlántico de Guatemala en diferentes épocas del año, para identificar microalgas estacionales en cada muestra, pues estas pueden variar dependiendo el clima (temperatura, precipitación pluvial, corrientes oceánicas, efecto antropológico).
2. Enriquecer el cepario a partir de una identificación más extensa, de muestras de agua, tomadas en diferentes tiempos, se recomienda enriquecer el cepario, para proveer más recursos para investigaciones posteriores.
3. Experimentar diferentes tipos de aislamiento, además de la micromanipulación, como lo son el rayado en agar o la dilución, para ampliar así la gama de especies aisladas y purificadas con éxito.
4. Utilizar antibióticos, durante la inoculación, para eliminar la presencia de bacterias en los cultivos.
5. Muestrear en cuerpos de agua dulce, para identificar especies nativas de este medio.
6. Monitorear el pH, temperatura, concentración de nutrientes, concentración de dióxido de carbono disuelto, densidad población, para optimizar el proceso de aislamiento, y prever parámetros específicos de cepas que requieren condiciones más controladas.