

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

FACULTAD DE PESQUERÍA



**“ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS MICROALGAS
Chlamydomonas sp. y *Pediastrum* sp. COMO RESPUESTA A LA
RADIACIÓN UV Y ALTITUD DE ORIGEN”**

Presentado por:

JORMAN ALEXANDER HENRIQUEZ RAMÍREZ

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
INGENIERO PESQUERO**

Lima – Perú

2018

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN LITERARIA	4
2.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS	4
a. Caracterización taxonómica y biología de la microalga del género <i>Pediastrum</i>	6
b. Caracterización taxonómica y biología de la microalga del género <i>Chlamydomonas</i>	7
2.2 PARAMETROS FISICO QUIMICOS EN EL CRECIMIENTO	7
a. Intensidad Lumínica	7
b. Temperatura	8
c. Nutriente	8
d. pH y CO ₂	8
e. Radiación ultravioleta (UV).....	9
Radiación ultravioleta en zonas alto andinas	10
2.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN LAS MICROALGAS	11
a. Mecanismo fisiológico para la formación de compuestos antioxidantes.....	14
b. Evaluación de la actividad antioxidante en las microalgas.....	15
III. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	17
3.2 UNIDADES BIOLÓGICAS Y MANEJO EXPERIMENTAL	17
a. Obtención de las cepas y de los inóculos microalgales	17
b. Descripción del cultivo y diseño experimental de las microalgas	21
b.1 Descripción del diseño experimental de la microalga del género <i>Pediastrum</i>	22
b.2 Descripción del diseño experimental de la microalga del género <i>Chlamydomonas</i>	22
c. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género <i>Pediastrum</i> y <i>Chlamydomonas</i>	23
d. Determinación de la actividad antioxidante.....	24
d.1 Preparación de la solución conteniendo el radical ABTS ⁺	24
d.2 Elaboración de la curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes	25
d.3 Obtención de los extractos microalgales a partir de los solventes hexano, acetona y agua	25

d.4 Determinación de la actividad antioxidante por método del radical catión ABTS ⁺	26
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1 OBTENCIÓN DE CEPAS MICROALGALES	28
4.2 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROALGAL	29
a. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género <i>Pediastrum</i>	29
b. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género <i>Chlamydomonas</i>	31
4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MICROALGAS	33
a. Elaboración de la curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes	33
b. Obtención y cuantificación de los extractos microalgales a partir de los solventes hexano, acetona y agua	34
c. Determinación de la actividad antioxidante del género <i>Pediastrum</i>	36
d. Determinación de la actividad antioxidante del género <i>Chlamydomonas</i>	37
4.4 DISCUSIÓN	38
V. CONCLUSIONES	43
VI. RECOMENDACIONES	44
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Descripción de los efectos de las bandas espectrales de radiación UV.	9
Cuadro 2: Estrategias de adaptación de las algas y Compuestos activos potenciales generados como defensa en situaciones de estrés.....	12
Cuadro 3: Propiedad antioxidante obtenidas a partir de extractos de algas.	12
Cuadro 4: Compuestos antioxidantes en diversas especies de microalgas.....	13
Cuadro 5: Distribución de las unidades biológicas por especie, altitud y unidad experimental.	21
Cuadro 6: Diseño experimental para las microalgas del género <i>Pediastrum</i>	22
Cuadro 7: Diseño experimental para las microalgas del género <i>Chlamydomonas</i> ...	23
Cuadro 8: Tasas de crecimiento promedio por intervalo de tiempo en los cultivos del género <i>Pediastrum</i> con y sin radiación UV.....	31
Cuadro 9: Tasas de crecimiento promedio por intervalo de tiempo en los cultivos de <i>Chlamydomonas</i>	33
Cuadro 10: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante por tratamiento en los cultivos de <i>Pediastrum</i>	37
Cuadro 11: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor altitud (msnm) de origen en los cultivos de <i>Pediastrum</i>	37
Cuadro 12: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor radiación ultravioleta en los cultivos de <i>Pediastrum</i>	37
Cuadro 13: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante por tratamiento en los cultivos de <i>Chlamydomonas</i>	38
Cuadro 14: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor altitud (msnm) de origen en los cultivos de <i>Chlamydomonas</i> .	38

Cuadro 15: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor radiación ultravioleta en los cultivos de *Chlamydomonas*.38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Cinética de crecimiento de un cultivo de microalga (Romo, 2002, modificado de Fogg y Thake, 1987). 1-Fase de adaptación; 2- Fase de crecimiento exponencial; 3- Fase declinación relativa de crecimiento; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte.	5
Figura 2: Descripción taxonómica de la microalga del género <i>Pediastrum</i> . FUENTE: ALGAE BASE (http://www.algaebase.org/search/genus/).	6
Figura 3: Descripción taxonómica de la microalga del género <i>Chlamydomonas</i> . FUENTE: ALGAE BASE (http://www.algaebase.org/search/genus/).	7
Figura 4: Niveles de irradiación solar en el mes de noviembre del departamento de Ayacucho. FUENTE: SENAMHI (http://deltavolt.pe/atlas/atlassolar/radiacion-departamento).	10
Figura 5: Índice de radiación ultravioleta para el día 23 de febrero del 2017. FUENTE: SENAMHI (http://www.senamhi.gob.pe/?p=radiacion-uv).	11
Figura 6: Mapa que muestra la ubicación de las lagunas muestreadas en el departamento de Ayacucho.....	18
Figura 7: Flujo de obtención de las cepas, A: aislamiento celular bajo microscopio invertido. B: cepario bajo condiciones controladas de irradiancia, T° y fotoperiodo. C: Tubos de cultivo con el crecimiento microalgal al mes de siembra.	19
Figura 8: Obtención de inóculos microalgales, A: siembra de inóculos de 125 mL en cámara de flujo laminar. B: siembra de inóculos de 500 mL. C: Inóculos de 1 L. ..	20
Figura 9: Interior de la Cámara climática adaptada para el experimento donde se muestra :(A: Fluorescentes de luz PAR, B: Fluorescentes de luz UV, C: biorreactores.	22
Figura 10: Biomasa seca obtenida mediante la liofilización de la biomasa húmeda de los cultivos experimentales.	24
Figura 11: Flujograma del Procedimiento para la obtención de extractos microalgales.....	26

Figura 12: Flujograma para la determinación de la actividad antioxidante por método del radical catión ABTS ⁺	27
Figura 13: Codificación según Banco de germoplasma de Organismos Acuáticos de las cuatro microalgas Chlorophytas obtenidas del proceso de aislamiento entre las del género <i>Chlamydomonas</i> y <i>Pediastrum</i>	28
Figura 14: Curvas de crecimiento de los cultivos de <i>Pediastrum</i> provenientes de diferente altitud (msnm) no expuestos a la radiación ultravioleta.	30
Figura 15: Curvas de crecimiento de los cultivos de <i>Pediastrum</i> provenientes de diferente altitud (msnm) expuestos a la radiación ultravioleta.	30
Figura 16: Curvas de crecimiento de los cultivos de <i>Chlamydomonas</i> provenientes de diferente altitud (msnm) no expuestas a la radiación ultravioleta.	32
Figura 17: Curvas de crecimiento de los cultivos de <i>Chlamydomonas</i> provenientes de diferente altitud (msnm) expuestas a la radiación ultravioleta.	32
Figura 18: Curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes para relacionar los equivalentes en trolox de las absorbancias obtenidas para los extractos microalgales.	34
Figura 19: Extractos microalgales obtenidos con los diferentes solventes hexano (A), acetona (B) y agua (C).	35
Figura 20: Concentración de la actividad antioxidante por extracción solvente (hexano, acetona, agua) para el género <i>Pediastrum</i> , con y sin radiación UV, proveniente de diferente altitud.	35
Figura 21: Concentración de la actividad antioxidante por extracción solvente (hexano, acetona, agua) para el género <i>Chlamydomonas</i> con y sin radiación UV, proveniente de diferente altitud.	36

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1: Análisis de ácidos grasos de la microalga del género <i>Pediastrum</i>	53
Anexo 2: Medias ajustadas de actividad antioxidante y errores estándares para factor altitud de origen de las microalgas del género <i>Pediastrum</i>	53
Anexo 3: Actividad antioxidante del género <i>Pediastrum</i> provenientes de zonas alto andinas.	54
Anexo 4: Actividad antioxidante, medias ajustadas y errores estándares para factor altitud de origen de las microalgas del género <i>Chlamydomonas</i>	54
Anexo 5: Actividad antioxidante del género <i>Chlamydomonas</i> provenientes de zonas alto andinas.	55
Anexo 6: Actividad antioxidante, medias ajustadas y errores estándares para factor radiación de las microalgas del género <i>Chlamydomonas</i>	55
Anexo 7: Actividad antioxidante del género <i>Chlamydomonas</i> expuestas a radiación ultravioleta.	56

DEDICATORIA

Dedico mi tesis de manera muy especial a mis cuatro maravillosas madres que me apoyan en cada paso que logro en esta aventura que es la vida, y a todos los amigos que me acompañaron en la realización de la tesis, sobre todo a los del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú por todo el conocimiento brindado.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Nacional de Ciencia y Tecnología FONDECYT que mediante el proyecto “Búsqueda, caracterización y cultivo de microalgas de zonas alto andinas del Perú potencialmente útiles en la industria cosmética” Convenio N° 201-2015-FONDECYT otorgó el financiamiento para el desarrollo de la presente tesis.

En primer lugar, agradecer de forma muy especial a la ingeniera Cecil Tenorio por su apoyo y confianza para llevar a cabo esta investigación.

A la responsable del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, Msc. Carla Aguilar y al equipo de trabajo del laboratorio: Blga. Hanna Hernández, Blgo. Pedro Sánchez, Tco. Marco Aguirre y Dra. Natalia Arakaki, por su apoyo, compañerismo y conocimientos para crecer profesionalmente.

Al Laboratorio de Análisis Instrumental dirigido por el químico Leenin Flores y al Qco. Anthony Ruiz, por su ayuda con los análisis y el uso de los equipos, y al Laboratorio de Alimento Vivo dirigido por la bióloga Gheraldine Ynga por permitirme el uso de su laboratorio.

Asimismo, me gustaría agradecer a todos los docentes de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina por el conocimiento brindado para mi crecimiento profesional, en especial a la profesora Jessie Vargas, quien me enseñó el mundo de las microalgas y me brindó su asesoría para la realización de este trabajo de investigación.

Y por último a mi compañera de laboratorio y colega Evelyn Fernández por su apoyo y brindarme ánimos para la realización de esta investigación.

RESUMEN

Las microalgas presentan un mecanismo de defensa en condiciones desfavorables para el crecimiento celular, permitiéndoles adaptarse a condiciones de estrés. Uno de estos mecanismos es la actividad antioxidante, que las protege del daño fotooxidativo causada por variaciones de los niveles de radiación. Esto es posible ya que las microalgas son capaces de acumular compuestos biológicamente activos (pigmentos, compuestos fenólicos, etc.) que las protegen. En la actualidad se busca reemplazar el uso de antioxidantes de origen sintético debido a su posible potencial cancerígeno, por lo cual se viene estudiando a las microalgas como posibles fuentes naturales. Este trabajo tuvo como objetivo el análisis de la actividad antioxidante de cuatro cepas microalgales obtenidas de zonas alto andinas de Ayacucho, departamento del Perú. El trabajo fue realizado en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú. Se cuantificó la actividad antioxidante presente en los extractos microalgales mediante el método del radical catión ABTS⁺; para lo cual se trabajó con dos cepas de *Pediastrum* sp. (Ped4400 y Ped3311) y dos cepas de *Chlamydomonas* sp. (Chl4440 y Chl3590), las que fueron cultivadas en volúmenes de 2 L con medio de cultivo CHU10 dentro una cámara climática durante siete días, teniendo como factores a considerar la radiación UVAB de 4mW/cm² ($\lambda=400-280$ nm) por un periodo de tres horas diarias y la altitud de origen de la cepa. Las cepas provenientes de las zona de mayor altitud fueron las que mejor se adaptaron a condiciones controladas; la cepa Ped4400 evidenció el valor más alto de actividad antioxidante, de 221.71 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ siendo no significativa la exposición a la radiación UVAB, superando a la cepa Chl4440 que alcanzó un valor de 105.61 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, para los cultivos expuestos a la radiación. Se concluye que ambas especies de microalgas son una fuente potencial de compuestos antioxidantes.

Palabras Clave: *Pediastrum*, *Chlamydomonas*, Actividad antioxidante Radiación UV, Altitud.

ABSTRACT

Microalgae have a defense mechanism for undesirable conditions for cell growth, allowing them to adapt to stress conditions. One of these mechanisms is the antioxidant activity, which protects them from photooxidative damage due to changes in the levels of radiation. This is possible because microalgae are capable of accumulating biologically active compounds (pigments, phenolic compounds, etc.) that serve as defense. At present, the use of antioxidants of synthetic origin is a need to be replaced due to its possible carcinogenic potential. By now microalgae are being studied as possible sources of natural origin. In this way the objective of this work was to analyze the antioxidant activity of four different microalgal strains obtained from highland areas of the department of Ayacucho-Peru. The antioxidant activity present in the microalgal extracts was quantified by the ABTS⁺ cation radical method; we worked with two strains of *Pediastrum* sp (Ped4400 y Ped3311) and two strains of *Chlamydomonas* sp. (Chl4440 y Chl3590), which were cultivated in 2 L with CHU10 culture medium in a climatic chamber for seven days, having as factors to consider the UVAB radiation of 4 mW/cm² ($\lambda = 400-280$ nm) for a period of three hours a day and the altitude of origin of the strain. The strains from highland areas were the best adapted to controlled conditions; the strain Ped4400 showed the highest value of antioxidant activity, of 221.71 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ being not significant the exposure to UVAB radiation, surpassing the strain Chl4440 that reached a value of 105.61 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, for crops exposed to radiation. It is concluded that both strains of microalgae are potential source of antioxidant compounds.

Keywords: *Pediastrum*, *Chlamydomonas*, Antioxidant activity, UV radiation, Altitude

I. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos que forman parte inicial de la red trófica de muchos seres acuáticos, aportando proteínas de alta calidad, pigmentos y lípidos con un gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Sánchez-Estudillo 2011), los cuales sirven como productos de almacenamiento y fuentes de energía. En su gran mayoría son organismos autótrofos, de reproducción por división binaria, lo que potencializa su crecimiento en ambientes controlados con luz solar, artificial o ambas al mismo tiempo. A su vez esto les permite un crecimiento rápido cuando se inoculan en un medio de cultivo no limitante y se mantienen en condiciones adecuadas (Arredondo y Voltolina, 2007).

Jacob-lopes et al. (2015), mencionan que debido a que las microalgas son capaces de vivir en ambientes extremos, el estudio de su metabolismo de adaptación y los diferentes compuestos que estos puedan acumular como respuesta a las variaciones fisicoquímicas las hacen de interés para las distintas industrias. Entre las respuestas que presentan las microalgas ante estas variaciones destaca su actividad antioxidante que lleva a la formación de biocompuestos (pigmentos, lípidos, compuestos fenólicos, etc.) que ayudan a asegurar su sobrevivencia. Gomez et al. (2016), señalan que las microalgas producen compuestos antioxidantes como respuesta protectora al daño producido por diferentes tipos de estrés como por ejemplo la radiación UV, la variación de temperatura, la iluminación excesiva, entre otros. Plaza del Moral (2010), hace mención que entre los factores físicos que favorecen esta respuesta está la disponibilidad de la luz, que conlleva a un aumento de carotenoides en las células, las que junto a las clorofilas y compuestos fenólicos son los principales compuestos antioxidantes (Cha et al., 2010; Hu et al., 2008; Wang et al., 2007).

Se conoce que dentro de la industria alimentaria continuamente se buscan aditivos que contrarresten el deterioro oxidativo de los distintos productos. Actualmente se viene aplicando antioxidantes sintéticos, en los cuales se ha demostrado su potencial cancerígeno como por ejemplo el butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), tertiary butylhydroquinone (TBHQ) y propyl gallate (PG) (Chen et al., 1992; Jaime et al., 2007; Li et al., 2007). Es bajo esta premisa que en la actualidad se buscan nuevas fuentes de antioxidantes naturales que puedan sustituir el uso de los antioxidantes sintéticos. Las microalgas son una opción atractiva de estudio y de producción masiva para la obtención de antioxidantes naturales, porque se ha demostrado que estos microorganismos son capaces de acumular este tipo de biocompuestos como protección frente a distintos factores físico-químicos amenazantes como la fotooxidación (Bidigare et al., 1993; Jacob-lopés et al., 2015; Yong y Lee, 1991).

El género *Chlamydomonas* es uno de más estudiados por su fisiología, debido a que presenta una rápida adaptación a condiciones controladas de laboratorio, bajos requerimientos nutricionales, y se ha demostrado su aplicación potencial en nutrición y usos comerciales (*Chlamydomonas* Collection, 2010; Harris, 2001).

Muchas especies del género *Pediastrum* son producto de investigación debido a su capacidad de bioremediadora en tratamientos de aguas (Ozer et al., 2012). Ambos géneros (*Pediastrum* y *Chlamydomonas*) están reportadas en los cuerpos de aguas de las zonas alto andinas, adaptadas a condiciones extremas de temperatura, pH, radiación, etc. lo que motiva a investigar sobre el metabolismo de ambos frente a estresores como es la incidencia de la radiación UV (Tutin, 1940).

Es así que el presente estudio tuvo como objetivo general evaluar la actividad antioxidante de las microalgas del género *Chlamydomonas* y *Pediastrum* aisladas de las lagunas alto andinas del departamento de Ayacucho como respuesta a la radiación UV; y como objetivos específicos evaluar el crecimiento y la actividad antioxidante

de dos cepas de *Chlamydomonas* y dos cepas de *Pediastrum* provenientes de alturas mayores y menores a 4,000 msnm con y sin radiación UV.

II. REVISIÓN LITERARIA

2.1 GENERALIDADES DE LAS MICROALGAS

Las microalgas son capaces de acumular diferentes biocompuestos dependiendo de factores como la fase de cultivo, disponibilidad de nutrientes, irradiancia y temperatura, lo que altera su composición bioquímica, permitiendo manejar los cultivos con la finalidad de conseguir los valores nutricionales deseados (Cáceres, 2009; Hajimahmoodi et al., 2010; Lubián y Cañavate, 2001). A esto se le suma la capacidad de las microalgas para usar la energía de la luz y el CO₂ con una eficiencia mayor que las plantas superiores, lo que se refleja en una mayor producción de biomasa (Miao y Wu, 2006).

Cardozo et al. (2007), mencionan que las microalgas son una fuente importante de valiosos y novedosos compuestos, cuyos principales metabolitos secundarios comprenden lípidos, proteínas, polisacáridos, pigmentos y aminoácidos con diversas propiedades biológicas.

Las microalgas son consideradas alimentos funcionales, capaces no sólo de elevar el contenido nutricional de los alimentos tradicionales, sino también de afectar positivamente la salud de animales y humanos, debido a que contienen altas cantidades de proteínas, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados (omega – 3 y omega – 6) y antioxidantes (Quevedo et al., 2008).

Romo (2002), menciona que en el cultivo de microalgas es necesario el conocimiento de la cinética de crecimiento (Figura 1) en función de la especie y volumen al que es cultivada, se reconoce un patrón estándar de crecimiento indicado por las siguientes fases:

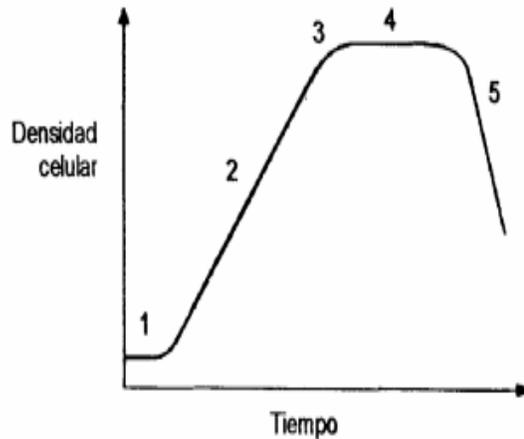


Figura 1: Cinética de crecimiento de un cultivo de microalga (Romo, 2002, modificado de Fogg y Thake, 1987). 1-Fase de adaptación; 2- Fase de crecimiento exponencial; 3- Fase declinación relativa de crecimiento; 4- Fase estacionaria; 5- Fase de muerte.

- Lag o fase de adaptación: En donde no ocurre incremento en el número de células, pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial. Se adaptan a las condiciones fisicoquímicas del cultivo.

- Fase exponencial: Ya una vez adaptadas al medio de cultivo, las microalgas comienzan a multiplicarse; puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse, el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.

- Fase de declinación relativa de crecimiento: En este caso conforme el cultivo va creciendo se da una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población; debido a esto las microalgas disminuyen su tasa de división celular.

- Fase estacionaria: Cuando ya no se aprecia una división celular neta, esto es que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto periodo de tiempo,

debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo.

- Fase de muerte: Las células pueden durar en la fase anterior semanas e incluso meses, aunque lo más normal es que comiencen a morir, es entonces cuando se presenta esta fase.

a. Caracterización taxonómica y biología de la microalga del género *Pediastrum*

Las microalgas del género *Pediastrum* se encuentran dentro de la división Chlorophyta, se caracterizan por ser coloniales, entre ocho y dieciséis células, formando un disco en forma de estrella plana. Este género de microalga presenta paredes celulares con un alto contenido de silicio, no frecuente en algas verdes (Millington y Gawlik, 1967). Estas habitan en aguas poco profundas de lagos, lagunas y cuerpos de agua donde es abundante la materia orgánica (Guamán y González, 2016).

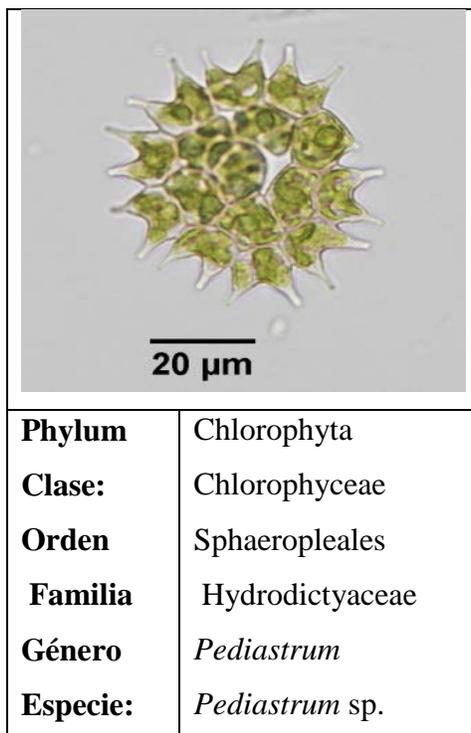


Figura 2: Descripción taxonómica de la microalga del género *Pediastrum*. FUENTE: ALGAE BASE (<http://www.algaebase.org/search/genus/>).

b. Caracterización taxonómica y biología de la microalga del género *Chlamydomonas*

Las microalgas del género *Chlamydomonas* se encuentran dentro de la división Chlorophyta, son microalgas verdes unicelulares con dos flagelos anteriores, tienen forma ovoide con una pared celular definida de aproximadamente 20 μ de largo y 10 μ de ancho (Harris, 2001; Jaén y Fernández, 1985). Este género habitan en cuerpos de aguas continentales, registrándose la especie *Chlamydomonas nivalis* que es capaz de habitar ambientes acuáticos con bajas temperaturas (Bidigare et al., 1993).

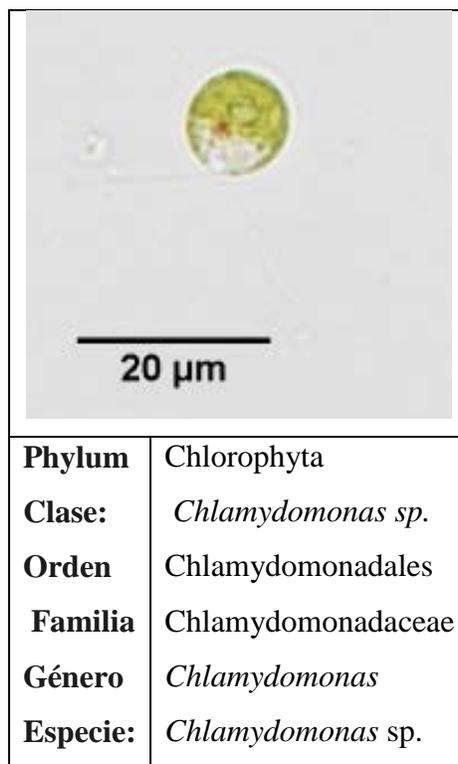


Figura 3: Descripción taxonómica de la microalga del género *Chlamydomonas*.
FUENTE: ALGAE BASE (<http://www.algaebase.org/search/genus/>).

2.2 PARAMETROS FISICO QUIMICOS EN EL CRECIMIENTO

a. Intensidad Lumínica

Este parámetro es uno de los más importantes a considerar en los cultivos microalgales autótrofos. Se expresa como el flujo de luz por unidad de área (irradiancia) que comprende la región espectral de los 400 a 700 nm (González,

2015). Existe un punto óptimo de irradiancia que favorece el crecimiento (Park et al., 2011); por otro lado el exceso de irradiancia produce una fotoinhibición, provocando una disminución de la actividad fotosintética e inclusive la muerte celular (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

b. Temperatura

El crecimiento microalgal aumenta proporcionalmente con la temperatura (Park et al., 2011), existiendo tres temperaturas a considerar: la temperatura mínima, donde el crecimiento no existe si se encuentra por debajo de esta, una temperatura optima, que generalmente varía entre los 16 y 27°C, y una temperatura máxima, donde el crecimiento no existe si se encuentra por encima de esta (Gonzáles, 2015). Por otro lado no solo se ve afectado el metabolismo celular, sino también los requerimientos nutricionales, composición de la biomasa y la solubilidad de los gases en el agua (Moronta et al., 2006).

c. Nutriente

Los nutrientes son parte del medio de cultivo, existiendo un balance fundamental entre los macronutrientes y micronutrientes para el óptimo crecimiento celular. Esto varía de forma específica entre las diferentes especies (Gonzáles, 2015). Los nutrientes más importantes son el carbono, el nitrógeno y el fósforo, siendo este último fundamental en muchos procesos celulares (Grobbelaar, 2004). La concentración de nitrógeno en el medio de cultivo es un factor que regula el contenido de lípidos en las microalgas, existiendo una relación inversamente proporcional cuando existe un déficit de este nutriente (Park et al., 2011).

d. pH y CO₂

El pH del cultivo está influenciado por las concentraciones de CO₂, para el caso de microalgas dulce acuícolas se encuentra entre 7 y 8 (Gonzáles, 2015; Park et al., 2011). Este nivel puede controlarse con una inyección de CO₂, que permite también el suministro necesario para cultivos de alta productividad (Martínez García, 2012).

e. Radiación ultravioleta (UV)

La radiación solar referida a la longitud de onda es expresada en nanómetros (nm) y abarca la radiación visible (luz), radiación infrarroja (IR) y la radiación ultravioleta (UVR), siendo esta última estudiada por los efectos en la salud humana. La radiación UV se divide en tres bandas espectrales que son la radiación UV-A, UV-B y la UV-C, que se describen en el Cuadro 1, estas pueden ser medidas como una irradiancia (potencia incidente sobre una superficie de una unidad de área) en unidades W/m^2 , o como exposición radiante o dosis (energía incidente sobre una superficie de área unidad) en J/m^2 (Vallejo, 2003).

Cuadro 1: Descripción de los efectos de las bandas espectrales de radiación UV.

UV-A	Responsables del bronceado y es la radiación continuo a la visible, variando entre los 400 y 320 nm.
UV-B	Es muy peligrosa para la vida al exponerse a tiempos prolongados, siendo la causante de muchas enfermedades de la piel y ojos (cáncer a la piel, cataratas, etc.), varía entre 320 y 280 nm.
UV-C	Es la más peligrosa para el ser humano y es absorbida por la capa de ozono, está por debajo de los 280 nm.

FUENTE: Información tomada de Vallejo, 2003.

Estudios han demostrado que la radiación UV inhibe la fotosíntesis de microalgas, lo que evidencia un efecto negativo en el crecimiento (Hughes, 2006) y recientemente se ha demostrado que la exposición a altos niveles de radiación genera estrés oxidativo (Cheloni y Slaveykova, 2018). Por otro lado se habla de un efecto especie-específica que logra una capacidad de fotoadaptación (Estevez et al., 2001; Guan et al., 2011; Wong et al., 2007). Se ha reportado un incremento de compuestos biológicamente activos a la exposición de radiación UV (Copia et al., 2012; Duval et al., 2000; Kováčik et al., 2010).

Radiación ultravioleta en zonas alto andinas

La radiación UV aumenta con la altitud debido a que la cantidad de absorbentes en la atmósfera decrece con la altura. Las medidas demuestran que la radiación UV aumenta entre un 6% y un 8% por cada 1000 m de elevación (Vallejo, 2003).

La actividad fotosintética de las microalgas es afectada por los niveles de radiación ultravioleta (UVR), inhibiéndose hasta en un 80% en aguas superficiales en el Lago Titicaca (3810msnm) donde existen altos flujos de UVR solar a lo largo del año (Villafañe et al., 1999).

En zonas alto andinas como el Lago Titicaca la radiación solar es mayor en un 13% que en zonas al nivel del mar (Dejoux e Iltis 1992). En la Figura 4, se muestra el mapa de irradiación solar del departamento de Ayacucho durante los años 1975-1990, elaborado por el Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI) donde se describen niveles de energía solar incidente diaria mayores a los 7 KW h/m² durante el mes de noviembre.

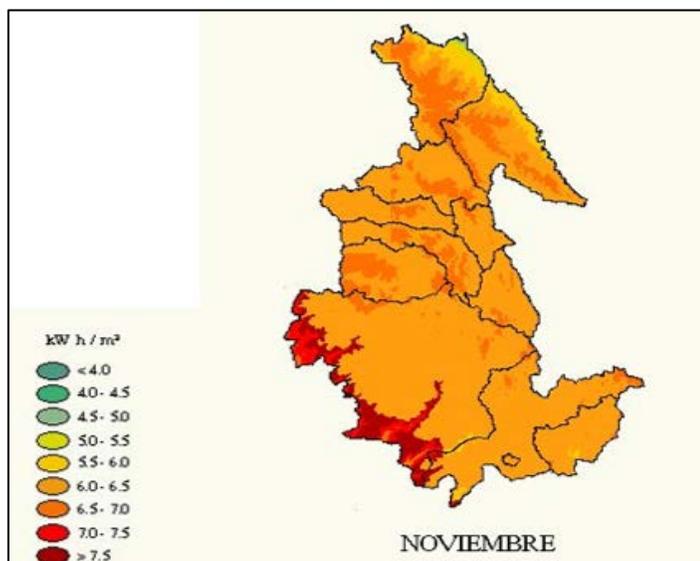


Figura 4: Niveles de irradiación solar en el mes de noviembre del departamento de Ayacucho. FUENTE: SENAMHI (<http://deltavolt.pe/atlas/atlassolar/radiacion-departamento>).

En la actualidad el SENAMHI tiene una plataforma virtual donde se muestran los índices de radiación ultravioleta según el índice de exposición (Figura 5), evidenciando en la curva elaborada una alta radiación durante horas del mediodía (10:00am-2:00pm).

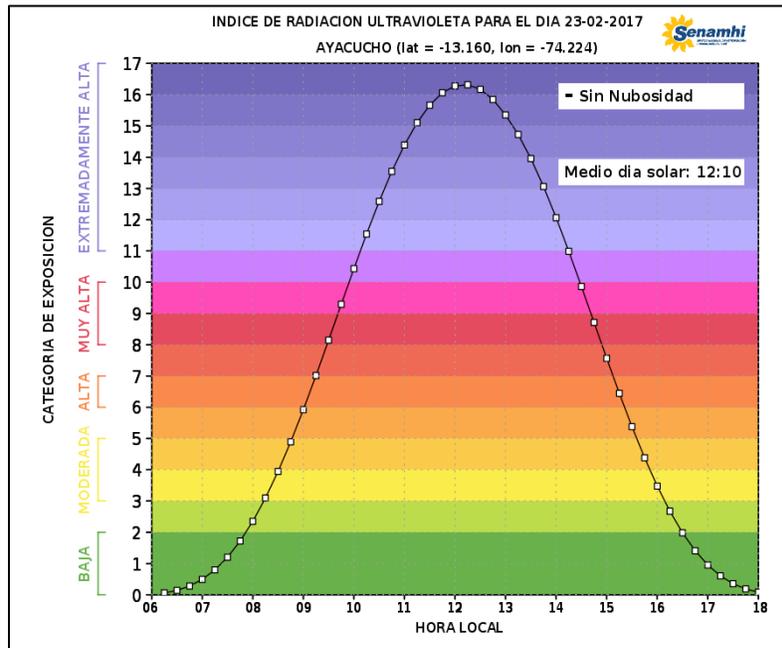


Figura 5: Índice de radiación ultravioleta para el día 23 de febrero del 2017. FUENTE: SENAMHI (<http://www.senamhi.gob.pe/?p=radiacion-uv>).

2.3 COMPUESTOS ANTIOXIDANTES EN LAS MICROALGAS

Se sabe que las microalgas habitan en diferentes cuerpos de agua, adaptándose a condiciones en muchos casos extremos y/o generadoras de estrés (variaciones de temperatura, salinidad, irradiación, etc.), debido a que poseen un metabolismo de adaptación funcional, generando metabolitos secundarios, que son compuestos biológicamente activos que les sirven como protección y que se muestran en el cuadro 2 (Jacob-Lopes et al., 2015; Pelegrín, 2001).

Cuadro 2: Estrategias de adaptación de las algas y Compuestos activos potenciales generados como defensa en situaciones de estrés.

Estrategias de adaptación de las algas	Compuestos activos potenciales
Lucha contra la deshidratación y regulación del flujo hídrico (estrés de desecación, variación térmica)	Compuestos osmoreguladores: solutos minerales (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻) y orgánicos (polioles, prolina, manosa, sacarosa, floridoside), mucílago.
Protección contra los efectos de los rayos ultravioleta y el estrés oxidativo	Filtros naturales, antioxidantes (carotenoides, polifenoles, tocoferoles), enzimas antiradicales, Cu, Zn, Se.
Mantenimiento de la integridad de los tejidos en respuesta al oleaje	Mucílago, fibras elásticas, proteínas y polisacáridos estructurales (agar, carragenato, alginato)
Mantenimiento de la integridad de los tejidos en respuesta a microorganismos predadores	Metabolitos secundarios halogenados: bromofenoles

FUENTE: Tomado de Pelegrín, 2001

El término de antioxidantes hace referencia principalmente a pigmentos antioxidantes como clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos (Cha et al., 2010; Hu et al., 2008; Wang et al., 2007). Entre las distintas sustancias antioxidantes (Cuadro 3) que generan las microalgas destacan los compuestos liposolubles como la vitamina E (o alfa-tocoferol), clorofilas y los carotenoides, y los compuestos hidrosolubles que son los polifenoles, las ficobiliproteínas y la vitamina C (Herrero et al., 2006; Pelegrín, 2001).

Cuadro 3: Propiedad antioxidante obtenidas a partir de extractos de algas.

ANTIOXIDANTES	Proteínas
	Micosporina Aminoácidos
	Glutación
	Polifenoles
	PUFAs
	Carotenoides
	Tocoferol
	Ascorbato

FUENTE: Tomado de Michalak y Chojnacka, 2015.

Las microalgas presentan una gran biodiversidad sobre las plantas superiores y son considerados un recurso casi sin explotar en cuanto a sus propiedades antioxidantes. En el Cuadro 4 se describe ciertas especies de microalgas generadoras de antioxidantes, para los cuales se debe tener en cuenta diversos factores como las características fisiológicas y condiciones del cultivo (Hun, 2010).

Cuadro 4: Compuestos antioxidantes en diversas especies de microalgas.

Compuestos	Especies de microalgas
Astaxantina	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Polifenoles	<i>Chlamydomonas nivalis</i>
C-ficocianina	<i>Spirulina platensis</i>
Vitamina C	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>

FUENTE: Tomado de Pelegrín, 2001.

El género *Chlamydomonas* es una de las microalgas más utilizadas para pruebas de fisiología celular y biología molecular debido a que presenta un ciclo de vida simple, fácilmente manipulable en laboratorio, tienen un mínimo requerimiento nutricional y un rápido crecimiento, sin embargo, poco se ha estudiado sobre su potencial nutricional y usos comerciales (*Chlamydomonas* Collection, 2010; Harris, 2001).

Existen antecedentes de estudios del género *Chlamydomonas* referidos a la capacidad antioxidante como es el caso de la especie *Chlamydomonas nivalis* donde se demostró que es una fuente natural de antioxidantes (Duval et al., 2000; Li et al., 2007), debido a que posee carotenoides como β -caroteno, luteína, violaxantina, polifenoles, entre otros (Jaén y Fernandez, 1985). Por otro lado, el género *Pediastrum* es una de las microalgas consideradas como bioindicadoras del estado de eutrofia de los ecosistemas acuáticos de agua dulce, soportando niveles medios y altos de contaminación (Rivero, 2016). En un trabajo realizado por Ozer et al. (2012), se utilizó a la microalga *Pediastrum boryanum* para el tratamiento de aguas residuales en función a su capacidad de biosorción del metal cromo (Cr IV).

a. Mecanismo fisiológico para la formación de compuestos antioxidantes

Los pigmentos fotosintéticos son las sustancias encargadas de transformar la energía lumínica en energía química mediante la fotosíntesis (Palacios, 2016), entre los cuales destaca la clorofila a, siendo uno de los pigmentos primarios encargados de la captación de la energía lumínica (Manrique, 2003). Existen también otro grupo de pigmentos accesorios como la clorofila b y carotenoides (carotenos y xantofilas), que cumplen la función de ampliar el espectro de absorción de la luz entre los 380 nm y los 710 nm (Larcher, 1995), con la finalidad de servir como sistemas de protección frente a la luz excesiva (fotoprotección) (Taíz y Zeiger, 2006).

El mecanismo de funcionamiento fisiológico de la fotosíntesis está constituida principalmente de moléculas de clorofilas distribuidas en los tilacoides en estructuras captadoras de luz denominadas complejo antena, que constituyen una serie de pigmentos unidos a proteínas que a su vez se encuentran conectados a sendos fotosistemas I y II (PS I y PS II) a través de un centro de reacción, donde se contienen los aceptores y transportadores de electrones excitados por los fotones (energía) absorbidos (Manrique, 2003; Palacios, 2016).

En la transferencia de electrones se genera la disipación de energía, evidenciándose un proceso que se conoce como fluorescencia, donde se emite un fotón de mayor longitud de onda, el cual en su mayor parte es emitido por la clorofila a en el PSII. La cantidad de fluorescencia se mide por la eficiencia de transferencia de los electrones, incrementándose si el proceso está en condiciones excesivas de luz, produciendo un excesivo aumento de electrones excitados que puede dañar la célula (Manrique, 2003; Palacios, 2016).

Los pigmentos accesorios principalmente los carotenoides, son los antioxidantes encargados de disipar el exceso de energía de excitación en forma de calor evitando daños en las células. También son los responsables de la detoxificación de las formas reactivas de oxígeno (como radicales libres), que se forman en la fotosíntesis,

evitando la fotoxidación en las células en presencia excesiva de luz (Manrique, 2003; Palacios, 2016).

La composición de carotenoides en las microalgas puede presentar una gran variación relacionada principalmente con factores medioambientales, como son, la temperatura del agua, la salinidad del medio, la disponibilidad de luz, la irradiancia y así como la disponibilidad de nutrientes (Plaza del Moral, 2010). La radiación UV-A estimula la acumulación de carotenoides sin pérdida de viabilidad mientras que la radiación UV-B influye en la acumulación de β -caroteno y en el daño de la viabilidad celular en cultivos de *Dunaliella salina* (Casal 2010). Estudios con *Nannocloropsis* sp. demuestran el efecto de la radiación UV-A en la acumulación de antioxidantes como carotenoides (Forján et al., 2011). También se ha demostrado que dentro de los compuestos fenólicos (polifenoles) que actúan como antioxidantes se encuentran los flavonoides, que presentan una fuerte absorción de la región UV de 300-400 nm, actuando como filtros de luz para la protección de los cloroplastos ante el daño generado por la radiación (Chávez et al., 1996).

b. Evaluación de la actividad antioxidante en las microalgas

En la actualidad se han realizado adaptaciones de métodos aplicados a la evaluación de la actividad antioxidante total de plantas superiores, frutas, macroalgas, etc. para el análisis de microalgas.

Rao et al. (2006), realizaron estudios de la actividad antioxidante de la microalga *Botryococcus braunii* donde se determinó la actividad captadora de radicales libres, evaluada mediante el método del 1,1- difenil-2-picrilhidracil (DPPH), obteniendo resultados favorables para esta microalga, siendo similares a los obtenidos por Díaz (2012), en las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Botryococcus braunii*; mientras que Re et al. (1999), describen un protocolo para la determinación de la actividad antioxidante por el método del 2,2 azono bis (3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), que consiste en la formación del radical libre ABTS⁺ y

que es reducido por los compuestos antioxidantes presentes en la muestra, para luego ser medida su absorbancia a 734nm.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El estudio se llevó a cabo en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), con apoyo de las áreas de Alimento vivo y el laboratorio de Instrumentación Analítica de la misma institución, durante el año 2017, en los meses de enero a octubre.

3.2 UNIDADES BIOLÓGICAS Y MANEJO EXPERIMENTAL

a. Obtención de las cepas y de los inóculos microalgales

Se utilizaron cuatro cepas de microalgas, dos del género *Pediastrum* y dos del género *Chlamydomonas*. Estas fueron aisladas de muestras de agua colectada de la laguna Pachaya (14°38'54'' S y 74°5'17''WO, 3590 msnm), laguna verde (14°31'56''S y 74° 0'40''WO, 4440 msnm), laguna Yahuirihuirí (14°37'50.7''S y 73° 57'17''WO, 4400msnm) y la laguna Pumacocha (13°35'49''S y 74°00'45.3''WO, 3311 msnm), proveniente del departamento de Ayacucho.

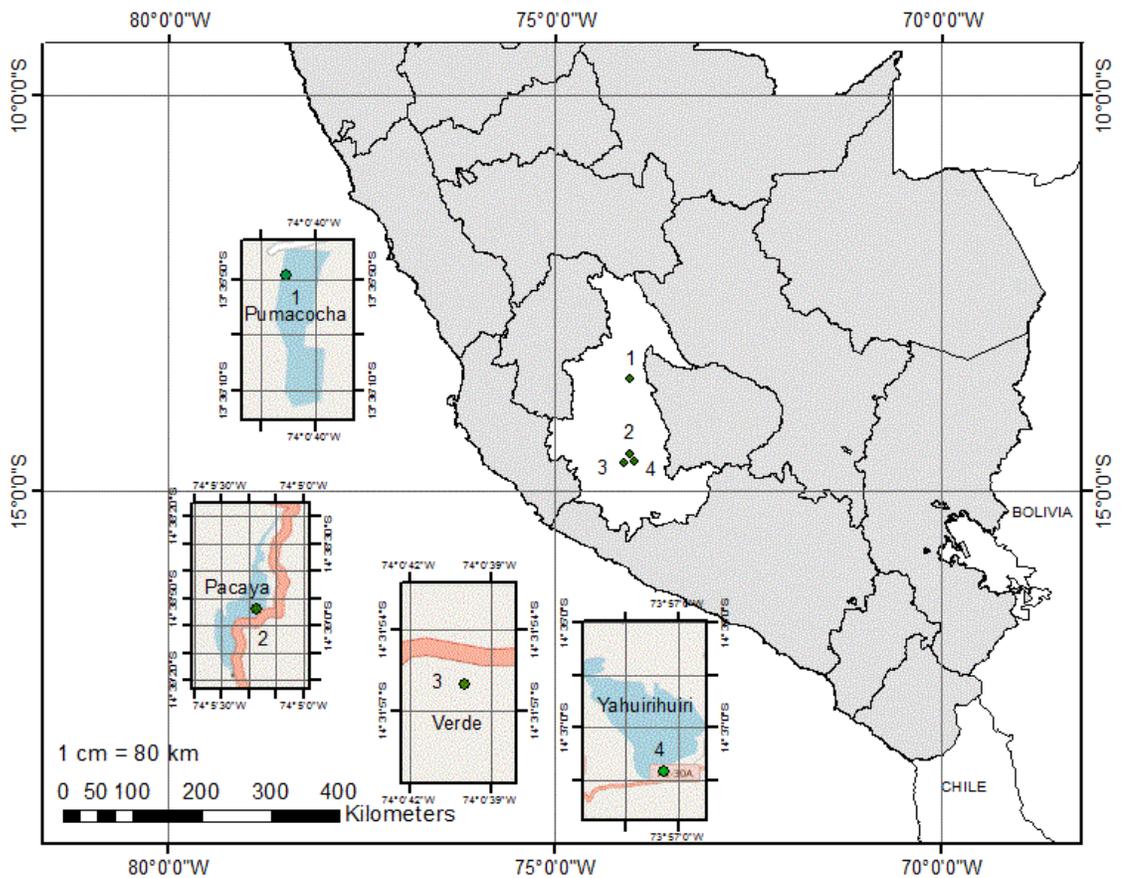


Figura 6: Mapa que muestra la ubicación de las lagunas muestreadas en el departamento de Ayacucho.

Las cepas se obtuvieron mediante la metodología planteada por Andersen (2005) del lavado celular con micropipetas, que permitió realizar el aislamiento de una sola célula para obtener cultivos monoclonales.

El método consistió en colocar una gota de muestra de agua con microalgas sobre una lámina porta objeto, observándola bajo un microscopio invertido a un objetivo de 10X y 40X respectivamente, seleccionando la microalga de interés para el estudio (Figura 7A). Esta fue capturada con la ayuda de una micropipeta capilar de punta fina, para comenzar con el lavado, transfiriéndola a una gota de medio de cultivo CHU10 estéril; esto se realizó por 4 a 5 veces sucesivas hasta que la célula microalgal se encontró en una gota de medio libre de contaminantes. Luego esta fue traspasada a

un tubo de ensayo de 10 mL con medio de cultivo estéril (2-3 mL) y llevada al cepario (Figura 7B) para su adaptación bajo condiciones controladas, a una temperatura de 17°C, intensidad lumínica de 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{seg}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ y un fotoperiodo de 12:12 (horas luz: horas oscuridad). Tardó aproximadamente un mes a que el tubo evidencie el crecimiento celular, el que fue analizado con una muestra extraída con una pipeta Pasteur estéril, y bajo microscopio se evaluó su crecimiento y la presencia de contaminantes (Figura 7C).

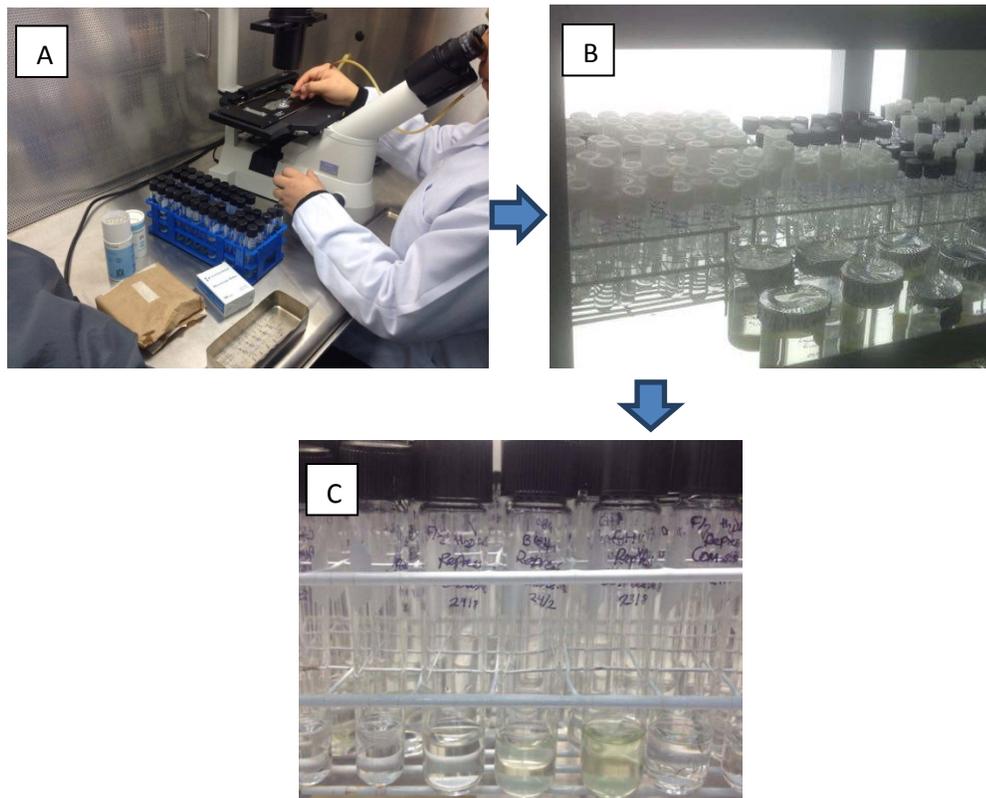


Figura 7: Flujo de obtención de las cepas, A: aislamiento celular bajo microscopio invertido. B: cepario bajo condiciones controladas de irradiancia, T° y fotoperiodo. C: Tubos de cultivo con el crecimiento microalgal al mes de siembra.

Una vez logrado el crecimiento en el tubo de cultivo, libre de contaminación (presencia de protozoarios u otra microalgas) se procedió a su codificación, y al sembrado en un tubo de 10 mL con un volumen de 8 mL efectivos.

Obtenidas las cepas se procedió al cultivo de los inóculos microalgales hasta el volumen de 1 L siguiendo el siguiente proceso:

- Se utilizó un tubo de 10 mL de la microalga como inóculo en un matraz de 125 mL con 115 mL de medio de cultivo CHU 10 y se llevó a condiciones de cepario por un periodo de 7 días, posteriormente se procedió a utilizar los 125 mL de microalga como nuevo inóculo para un volumen en matraz de 250 mL a las mismas condiciones.

- El procedimiento anteriormente descrito se realizó sucesivamente hasta lograr un volumen en matraz de 1 L de la microalga (Figura 8) que fue trasladado al área del laboratorio de alimento vivo donde las condiciones de cultivo fueron de temperatura 18°C, aireación constante con inyección de CO₂ e intensidad lumínica de 80 $\mu\text{mol seg}^{-1}\text{m}^{-2}$, por un periodo de 5 días. A continuación, se procedió al desdoble de la microalga (500 mL microalga y 500 mL medio de cultivo) para obtener 2 matraces de 1 L de inóculo.

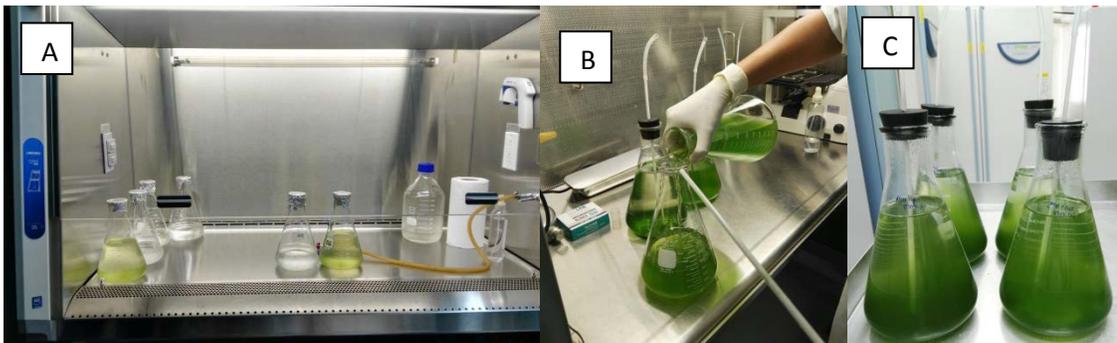


Figura 8: Obtención de inóculos microalgales, A: siembra de inóculos de 125 mL en cámara de flujo laminar. B: siembra de inóculos de 500 mL. C: Inóculos de 1 L.

Todo lo anteriormente descrito se realizó por triplicado con cada cepa hasta obtener los 6 L de inóculo, necesarios para la fase experimental.

b. Descripción del cultivo y diseño experimental de las microalgas

El experimento se realizó en unos recipientes de cultivo de 2 L por cada cepa microalgal, utilizando 1 L de inóculo de la microalga y 1 L de medio de cultivo CHU10 estéril en un biorreactor rectangular para lograr una mayor exposición a la radiación. Las cuatro unidades biológicas quedaron distribuidas como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 5: Distribución de las unidades biológicas por especie, altitud y unidad experimental.

Unidad Biológica (Cepas microalgales)	Unidad experimental
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Laguna verde 4440msnm)	6 biorreactores de 2 L
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Laguna Pachaya 3590msnm)	6 biorreactores de 2 L
<i>Pediastrum</i> sp. (Laguna Yahuirihui 4400msnm)	6 biorreactores de 2 L
<i>Pediastrum</i> sp. (Laguna Pumacocha 3311msnm)	6 biorreactores de 2 L

El experimento se realizó bajo condiciones controladas en una cámara climática Binder KW400 (Figura 9); a una temperatura de $18 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperiodo (12:12 horas luz: horas oscuridad), intensidad lumínica de $80 \mu\text{mol seg}^{-1}\text{m}^{-2}$ medida con un Quantiometro Licor, y aireación procedente de un Blower de 3.5 W de potencia, por un periodo de 7 días. Para los tratamientos con radiación ultravioleta se empleó unos fluorescentes de marca NARVA que emiten 4mW/cm^2 radiación UVA Y UVB, evaluada mediante un Radiómetro UVP, la exposición tuvo un periodo de 3 h día^{-1} .

En la figura 9 se muestra la disposición de las unidades experimentales en la cámara climática.

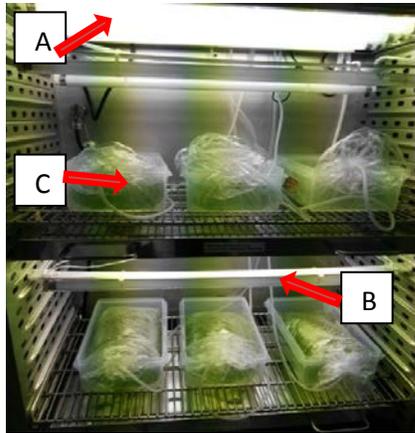


Figura 9: Interior de la Cámara climática adaptada para el experimento donde se muestra : (A: Fluorescentes de luz PAR, B: Fluorescentes de luz UV, C: biorreactores).

b.1 Descripción del diseño experimental de la microalga del género *Pediastrum*

Los tratamientos para el género *Pediastrum* provenientes de dos altitudes fueron repartidos en un diseño completamente al azar (DCA), cada uno con tres réplicas tal como se resume en el cuadro 6.

Cuadro 6: Diseño experimental para las microalgas del género *Pediastrum*.

TRATAMIENTOS		Radiación	
		-UVAB	+UVAB
Altitud	4400msnm	3 biorreactores	3 biorreactores
	3311msnm	3 biorreactores	3 biorreactores

-UVAB = Sin radiación
+UVAB = Con radiación

b.2 Descripción del diseño experimental de la microalga del género *Chlamydomonas*

Los tratamientos para el género *Chlamydomonas* provenientes de dos altitudes fueron repartidos en un diseño completamente al azar (DCA), cada uno con tres réplicas tal como se resume en el cuadro 7.

Cuadro 7: Diseño experimental para las microalgas del género *Chlamydomonas*.

TRATAMIENTOS		Radiación	
		-UVAB	+UVAB
Altitud	4440msnm	3 biorreactores	3 biorreactores
	3590msnm	3 biorreactores	3 biorreactores

-UVAB = Sin radiación
 +UVAB = Con radiación

c. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género *Pediastrum* y *Chlamydomonas*

Para la evaluación del crecimiento microalgal se muestrearon diariamente los cultivos de *Pediastrum* y *Chlamydomonas* de las unidades experimentales durante un periodo de 7 días.

El crecimiento celular de los cultivos fue evaluado mediante el método de conteo celular con ayuda de una cámara Neubauer. La toma de muestra para la evaluación se realizó diariamente a las 10:00am. Se procedió a retirar una muestra de 1mL de cada unidad experimental con ayuda de una pipeta Pasteur y colocadas en un vial de vidrio y fijadas con lugol para su posterior conteo.

El crecimiento microalgal se determinó mediante el parámetro de tasa de crecimiento poblacional (u), que se halló con la siguiente fórmula (Arredondo y Voltolina, 2007):

$$u = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1)$$

x_2 y x_1 : Densidad celular determinada en los tiempos t_2 y t_1

A los 7 días de cultivo se procedió a la cosecha de las microalgas. Para este fin se dejó decantar el cultivo para permitir su concentración y realizar el centrifugado (con una centrífuga Hettichzentrifu rotina 420R), a 3500rpm por 30min a 5°C. Las

microalgas sedimentadas obtenidas (biomasa húmeda) fueron colocadas en placas Petri para su liofilización y obtención de biomasa seca (Figura 10).

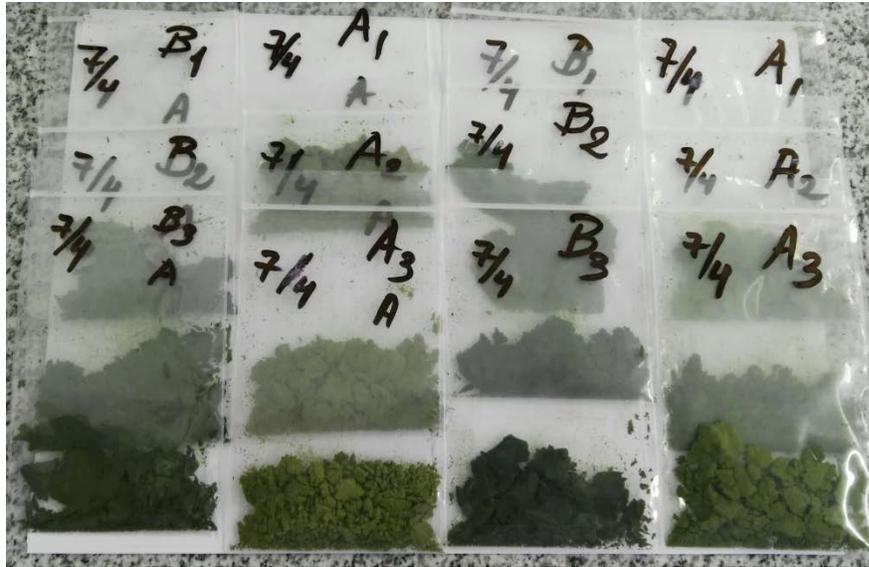


Figura 10: Biomasa seca obtenida mediante la liofilización de la biomasa húmeda de los cultivos experimentales.

d. Determinación de la actividad antioxidante

Se evaluó la actividad antioxidante total de las cuatro cepas microalgales a partir de la biomasa seca, utilizando el método de ABTS [2.2 azono bis (3 ethylbenzothiazoline 6 sulfonic acid)] descrita por Re et al. (1999).

d.1 Preparación de la solución conteniendo el radical ABTS⁺

- La solución ABTS⁺, fue preparada diluyendo 7 mM de ABTS y 2.45 mM de Persulfato de Potasio en agua ultra pura, almacenado en fiola ámbar de 25 mL, en oscuridad, a temperatura ambiente por 16 h.
- La dilución de la solución de ABTS⁺ se realizó con Etanol absoluto para lograr una absorbancia de 0.7 a 734 nm, medido en un espectrofotómetro VARIAN (UV visible).

d.2 Elaboración de la curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes

- Se preparó la solución trolox de 2.5mM con agua destilada, la que es un antioxidante comercial que sirvió como unidad equivalente de medida en la evaluación de los extractos microalgales.
- A partir de la solución trolox se prepararon 11 tubos con distintas concentraciones de 0 a 500 μ M, más 2 mL de la solución ABTS⁺. Esto se dejaron reposar por 6 min, luego de los cuales se procedió a realizar la lectura en el espectrofotómetro a 734nm.
- Esta curva de calibración patrón sirvió como referencia para las lecturas posteriores de los extractos microalgales en el espectrofotómetro.

d.3 Obtención de los extractos microalgales a partir de los solventes hexano, acetona y agua

Se pesó 0.05 g de la muestra microalgal seca en una balanza analítica marca Sartorius, y se siguió el procedimiento descrito en el flujograma presentado en la figura 11 para obtener los extractos microalgales.

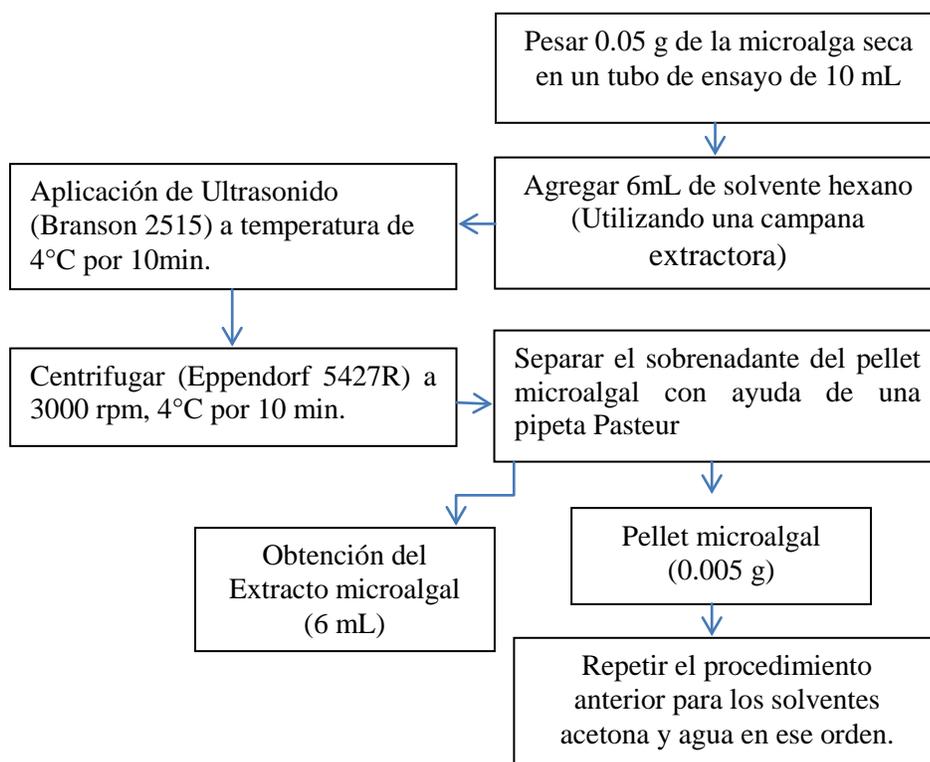


Figura 11: Flujograma del Procedimiento para la obtención de extractos microalgales.

Se permitió la evaporación de los extractos de hexano y acetona inyectando gas nitrógeno y se resuspendió en 2 mL de etanol absoluto para su posterior cuantificación.

d.4 Determinación de la actividad antioxidante por método del radical catión ABTS⁺

- En un tubo de ensayo se agregó 2 mL de solución ABTS⁺ más 150 μ L del extracto microalgal según flujograma mostrado en la Figura 12.
- La mezcla se dejó reposar por 6 min a temperatura ambiente, para posteriormente realizar las lecturas en el espectrofotómetro a 734nm.

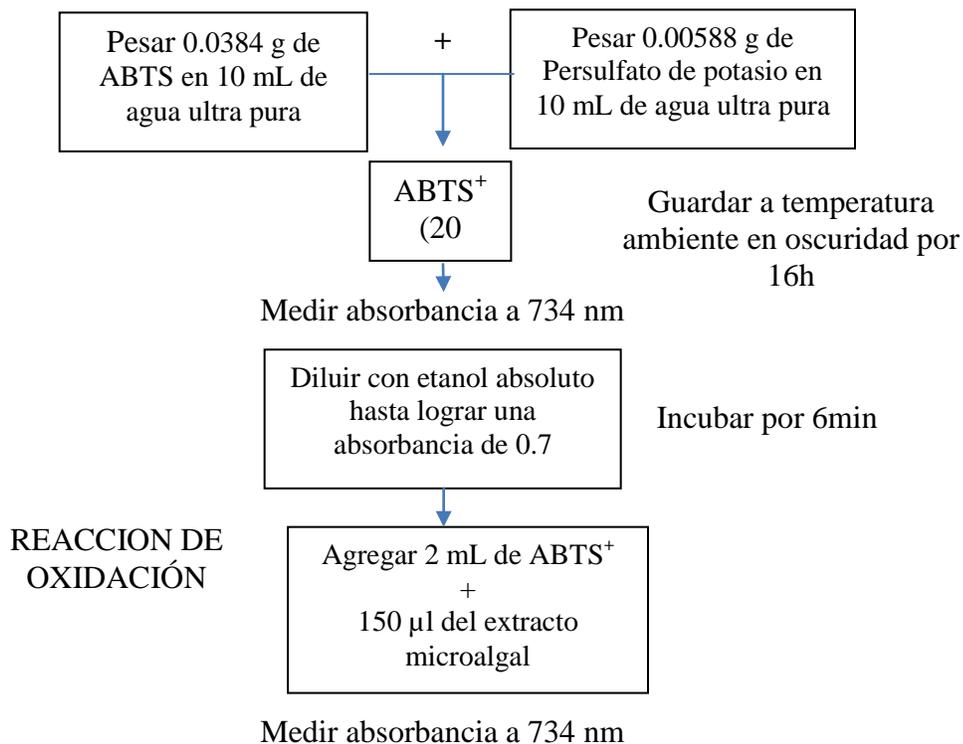


Figura 12: Flujograma para la determinación de la actividad antioxidante por método del radical catión $ABTS^+$.

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de homocedasticidad. Posteriormente a los datos de crecimiento celular se les aplicó un análisis de varianza (ANVA) con un $\alpha=0.05$, para determinar diferencias significativas entre tratamientos ante la radiación ultravioleta, utilizando el programa Minitab 17. Para la actividad antioxidante se realizó un análisis de varianza (ANVA) de dos factores con un $\alpha=0.05$, utilizando el software estadístico INFOSTAT versión estudiantil. Los factores que se evaluaron fueron la altitud de origen de las cepas microalgales y la radiación UVAB, teniendo como respuesta la tasa de crecimiento poblacional y actividad antioxidante respectivamente. Se realizó el test de comparaciones múltiples LSD de Fisher para ver diferencias significativas en las medias de los factores.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBTENCIÓN DE CEPAS MICROALGALES

Se obtuvieron cuatro cepas de microalgas Chlorophytas entre las del género *Chlamydomonas* y *Pediastrum*. (Figura 13) provenientes de las lagunas de Ayacucho, que fueron codificadas por el Instituto del Mar del Perú (IMARPE) en función a la base datos del Banco de Germoplasma de Organismo Acuáticos, para formar parte de la colección de las cepas del Laboratorio.

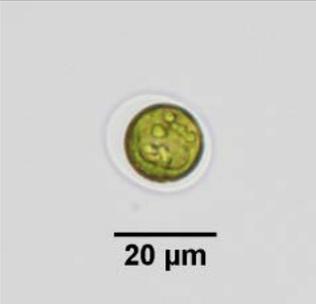
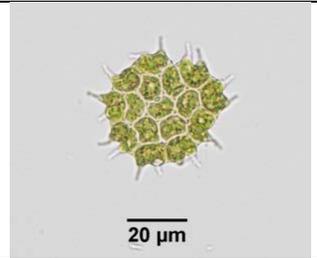
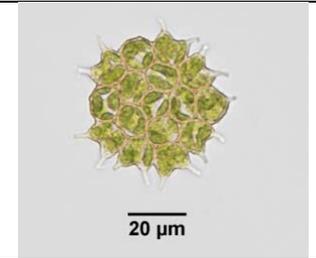
	
<p><i>Chlamydomonas</i> sp. Laguna verde 4440 msnm IMP-BG 277 (Chl4440)</p>	<p><i>Chlamydomonas</i> sp. Laguna Pachaya 3590 msnm IMP-BG 294 (Chl3590)</p>
	
<p><i>Pediastrum</i> sp. Laguna Yahuirihuirí 4400 msnm IMP-BG 288 (Ped4400)</p>	<p><i>Pediastrum</i> sp. Laguna Pumacocha 3311 msnm IMP-BG 255 (Ped3311)</p>

Figura 13: Codificación según Banco de germoplasma de Organismos Acuáticos de las cuatro microalgas Chlorophytas obtenidas del proceso de aislamiento entre las del género *Chlamydomonas* y *Pediastrum*.

IMP: Instituto del Mar del Perú

BG: Banco de Germoplasma de Organismo Acuáticos

4.2 DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROALGAL

a. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género *Pediastrum*

Al analizar las tasas de crecimiento poblacional durante el cultivo de la cepa de *Pediastrum* sp. proveniente de los 4400 msnm (Ped4400), se evidenció un mejor crecimiento bajo condiciones controladas respecto a la cepa procedente de menor altitud (Ped3311); tanto en los cultivos no expuestos a radiación UV (Figura 14) como en los expuestos (Figura 15). Así se tiene que la fase de adaptación, donde no se muestra crecimiento de los cultivos, sin radiación tuvo una duración de dos días, una fase exponencial marcada caracterizada por el crecimiento acelerado de cinco días y el inicio de la fase estacionaria el último día de cultivo; mientras que en los cultivos expuestos a la radiación ultravioleta se evidenció una adaptación de un día, seguida de una fase exponencial de cuatro días y una fase estacionaria de tres días hasta el término del experimento.

En la prueba con la cepa de *Pediastrum* sp. proveniente de los 3311 msnm (Ped3311); los cultivos que no fueron expuestos a radiación mostraron una fase de adaptación prolongada que duró cinco días y una fase exponencial de dos días, seguida del inicio de la fase estacionaria. Mientras que los cultivos que fueron expuestos a radiación ultravioleta tuvieron una fase de adaptación de un día y una fase exponencial no muy marcada (leve) de cuatro días, seguida de una fase estacionaria de tres días hasta el término del experimento.

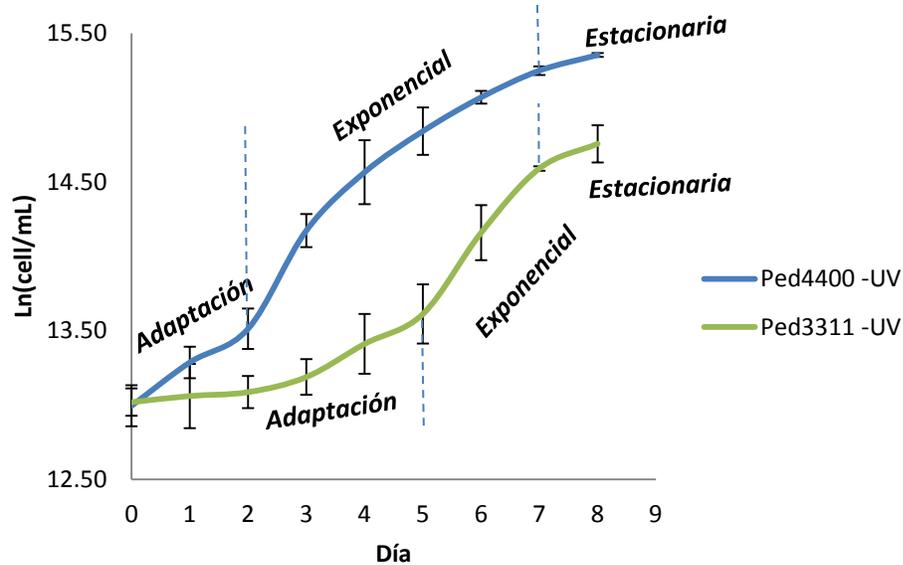


Figura 14: Curvas de crecimiento de los cultivos de *Pediastrum* provenientes de diferente altitud (msnm) no expuestos a la radiación ultravioleta.

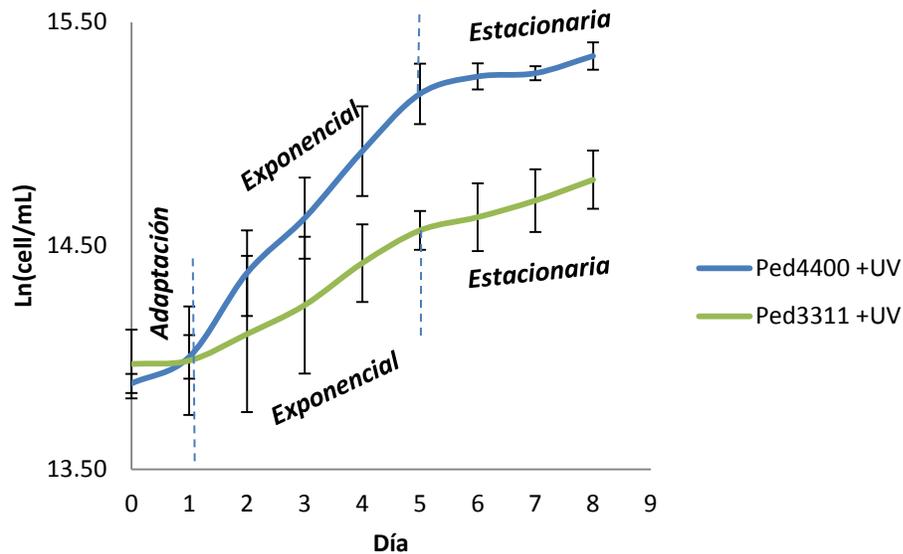


Figura 15: Curvas de crecimiento de los cultivos de *Pediastrum* provenientes de diferente altitud (msnm) expuestos a la radiación ultravioleta.

Por otro lado en el cuadro 8 se muestran las tasas de crecimiento (μ), con un efecto significativo para el factor altitud de origen al segundo día de cultivo ($\mu_{(\text{día}2-\text{día}3)}$); donde se observa que la cepa Ped4400 inició la fase exponencial ($\mu_{(\text{día}2-\text{día}3)}=0.66$),

mientras que la cepa Ped3311 mostró aún la fase de adaptación ($\mu_{(\text{día2}-\text{día3})}=0.10$) para el mismo tiempo. En las pruebas con radiación ultravioleta no se evidenciaron efectos significativos durante los 4 primeros días de cultivo; sin embargo a partir del 5 día de cultivo ($\mu_{(\text{día5}-\text{día6})}$), se vieron efectos significativos que coincidieron con la fase estacionaria para los cultivos expuestos a la radiación (Figura 15). Por otro lado, los cultivos que no estuvieron expuestos se encontraban en su fase exponencial (Figura 14).

Cuadro 8: Tasas de crecimiento promedio por intervalo de tiempo en los cultivos del género *Pediastrum* con y sin radiación UV.

Tratamientos		$\mu_{(\text{día0}-\text{día1})}$	$\mu_{(\text{día1}-\text{día2})}$	$\mu_{(\text{día2}-\text{día3})}$	$\mu_{(\text{día3}-\text{día4})}$	$\mu_{(\text{día4}-\text{día5})}$	$\mu_{(\text{día5}-\text{día6})}$	$\mu_{(\text{día6}-\text{día7})}$	$\mu_{(\text{día7}-\text{día8})}$
Ped4400	-UV	0.29	0.22	0.66 a	0.38	0.28	0.24 a	0.18	0.10
	+UV	0.12	0.37	0.25 a	0.30	0.26	0.08 b	0.02	0.08
Ped3311	-UV	0.03	0.04	0.10 b	0.21	0.20	0.55 c	0.44	0.16
	+UV	0.00	0.10	0.14 b	0.21	0.15	0.05 d	0.08	0.09

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

b. Evaluación del crecimiento de las microalgas del género *Chlamydomonas*

La cepa de *Chlamydomonas* sp. proveniente de los 4440 msnm (Chla4440), mostró un mejor crecimiento bajo condiciones controladas que la cepa Chl3590, tanto en los cultivos no expuestos a radiación UV (Figura 16) como en los expuestos (Figura 17). Los cultivos expuestos a la radiación ultravioleta evidenciaron un comportamiento muy similar a los cultivos que no estaban expuestos; una fase de adaptación de tres días y una fase exponencial de cinco días hasta el término del experimento; sin mostrar inicios de la fase estacionaria en ningún tratamiento.

En la prueba con la cepa de *Chlamydomonas* sp. proveniente de los 3590 msnm (Chla3590); de igual manera que la cepa Chla4440, los cultivos expuestos a la radiación ultravioleta mostraron un comportamiento muy similar a los cultivos que no estaban expuestos. Se evidenció una fase de adaptación de dos días, seguida de una fase exponencial de días y una fase estacionaria de 4 días hasta el término del

experimento. Los cultivos expuestos a la radiación tuvieron 1 día más de crecimiento exponencial.

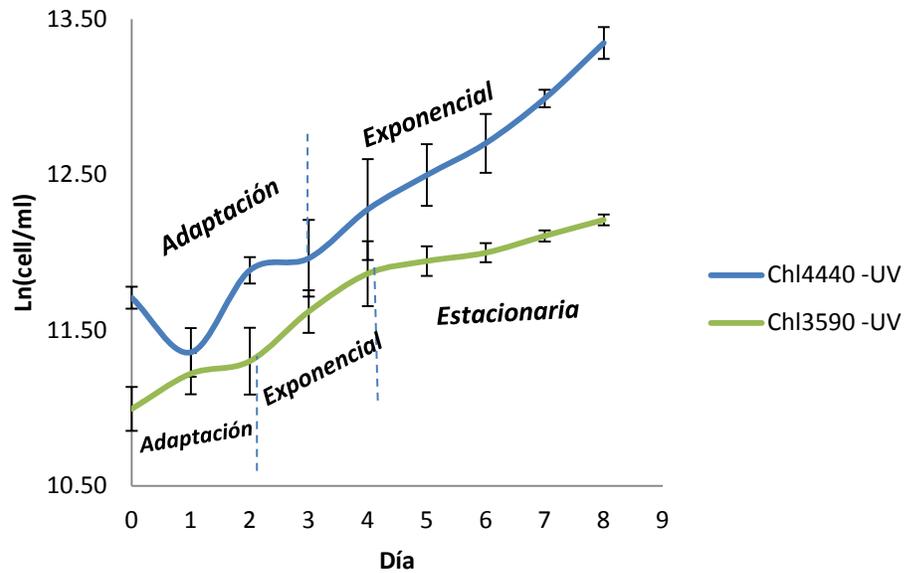


Figura 16: Curvas de crecimiento de los cultivos de *Chlamydomonas* provenientes de diferente altitud (msnm) no expuestas a la radiación ultravioleta.

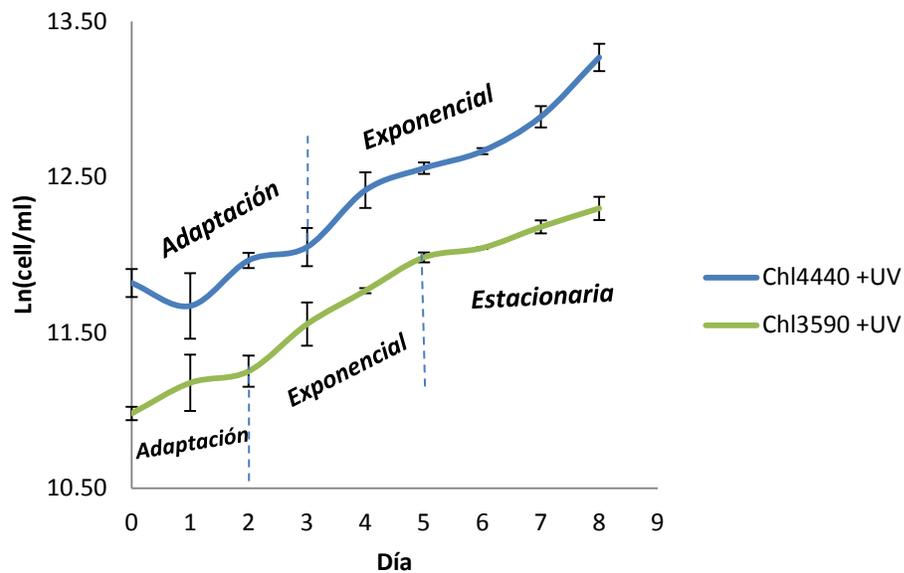


Figura 17: Curvas de crecimiento de los cultivos de *Chlamydomonas* provenientes de diferente altitud (msnm) expuestos a la radiación ultravioleta.

Por otro lado en el cuadro 9 se muestran las tasas de crecimiento (μ), con un efecto significativo para el factor altitud de origen a partir del quinto día de cultivo ($\mu_{(\text{día5- día6})}$); donde la cepa Chla4440 evidenciaba aún la fase exponencial ($\mu_{(\text{día5- día6})}=0.21$), alcanzando un valor de $\mu_{(\text{día7- día8})}=0.35$ el último día de cultivo, mientras que la cepa Chla3590 se encontraba en la fase estacionaria ($\mu_{(\text{día5- día6})}=0.06$) (Figura 16); la radiación ultravioleta no mostró efectos significativos.

Cuadro 9: Tasas de crecimiento promedio por intervalo de tiempo en los cultivos de *Chlamydomonas*.

Tratamientos	$\mu_{(\text{día0- día1})}$	$\mu_{(\text{día1- día2})}$	$\mu_{(\text{día2- día3})}$	$\mu_{(\text{día3- día4})}$	$\mu_{(\text{día4- día5})}$	$\mu_{(\text{día5- día6})}$	$\mu_{(\text{día6- día7})}$	$\mu_{(\text{día7- día8})}$	
Chl4440	-UV	-0.36	0.53	0.06	0.30	0.24	0.21 a	0.30 a	0.35 a
	+UV	-0.16	0.31	0.08	0.37	0.14	0.18 a	0.22 a	0.38 a
Chl3590	-UV	0.23	0.07	0.33	0.24	0.09	0.06 b	0.11 b	0.10 b
	+UV	0.19	0.08	0.30	0.22	0.21	0.06 b	0.13 b	0.12 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0.05$)

4.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN MICROALGAS

a. Elaboración de la curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes

Se obtuvo una curva patrón (Figura 18) para relacionar los equivalentes en trolox de las absorbancias obtenidas para los extractos microalgales.

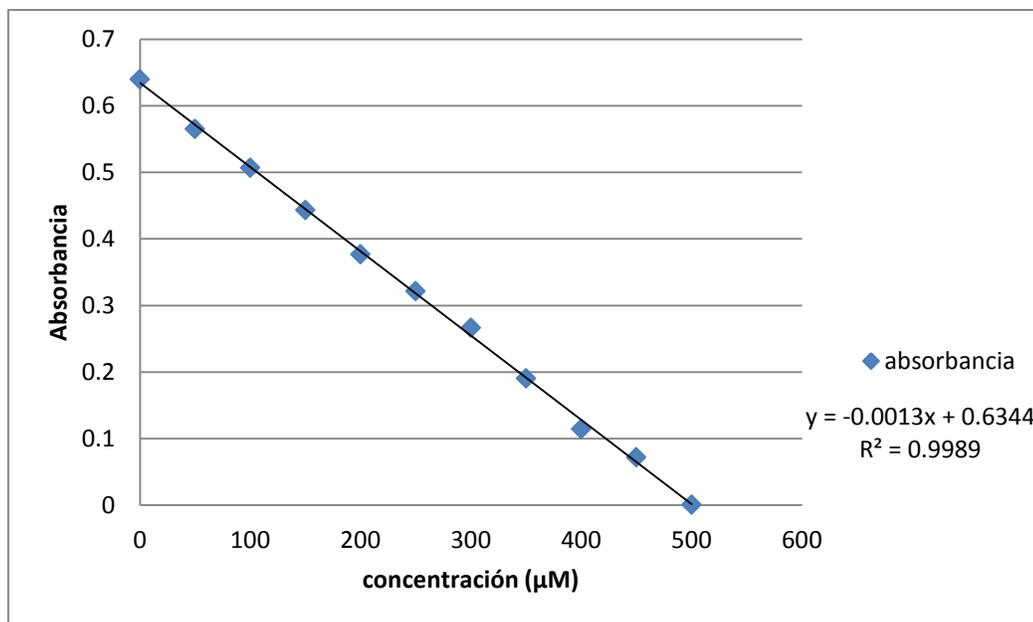


Figura 18: Curva de calibración típica de los ensayos de antioxidantes para relacionar los equivalentes en trolox de las absorbancias obtenidas para los extractos microalgales.

b. Obtención y cuantificación de los extractos microalgales a partir de los solventes hexano, acetona y agua

Al analizar la actividad antioxidante en los extractos obtenidos con los solventes hexano, acetona y agua (Figura 19), se evidenció para el género *Pediastrum* diferencias significativas al analizar los extractos de acetona respecto a la altitud de origen (Figura 20); obteniéndose una mayor actividad antioxidante en la cepa proveniente de mayor altitud.

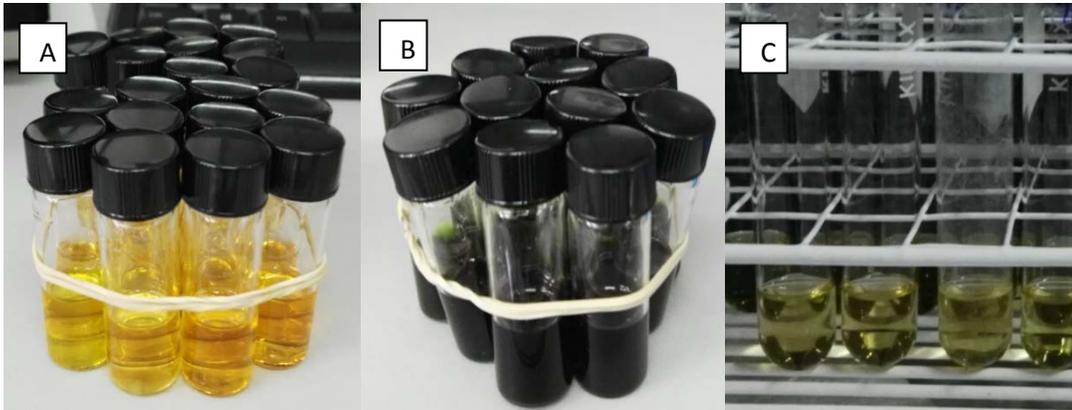


Figura 19: Extractos microalgales obtenidos con los diferentes solventes hexano (A), acetona (B) y agua (C).

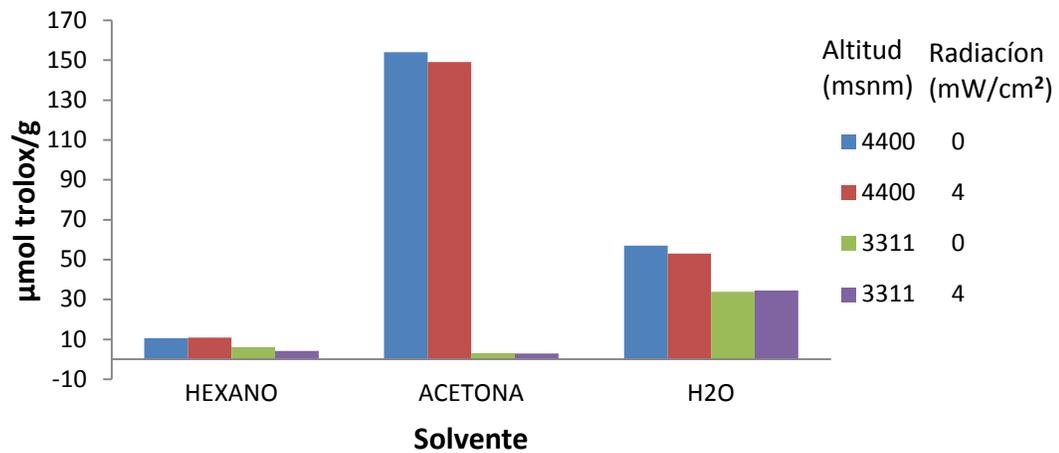


Figura 20: Concentración de la actividad antioxidante por extracción solvente (hexano, acetona, agua) para el género *Pediastrum*, con y sin radiación UV, proveniente de diferente altitud.

En las cepas del género *Chlamydomonas*, la solvente acetona mostró los mayores resultados de actividad antioxidantes en los cultivos expuestos a la radiación UVAB (Figura 21).

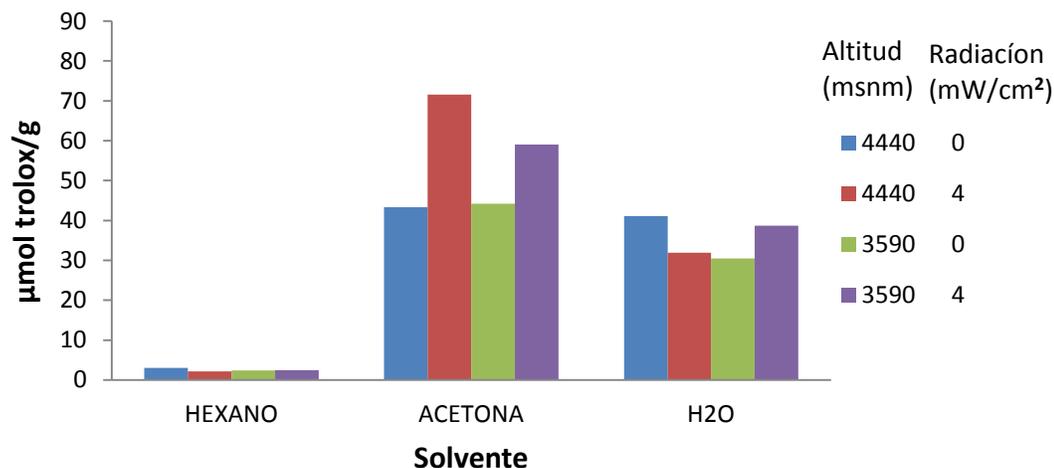


Figura 21: Concentración de la actividad antioxidante por extracción solvente (hexano, acetona, agua) para el género *Chlamydomonas* con y sin radiación UV, proveniente de diferente altitud.

c. Determinación de la actividad antioxidante del género *Pediastrum*

Aplicando el análisis de varianza se encontró que la altitud de origen de la cepa para el género *Pediastrum*, presentó un efecto significativo ($p < 0.05$) para la formación de compuestos antioxidantes (Cuadro 10). Esto indica que la altitud de origen es un factor que se tiene que tener en cuenta para poder potencializar la actividad antioxidante de cepas de este género. La cepa proveniente de mayor altitud (Ped4400), alcanzó un valor medio de $217.29 \mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ (Cuadro 11). Por otro lado, la radiación no mostró un efecto significativo para la actividad antioxidante (Cuadro 12), no existiendo interacción entre los factores.

Cuadro 10: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante por tratamiento en los cultivos de *Pediastrum*.

Tratamiento		Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$)
Ped4400	-UV	221.71 a
	+UV	212.87 a
Ped3311	-UV	42.99 b
	+UV	41.74 b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Cuadro 11: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor altitud (msnm) de origen en los cultivos de *Pediastrum*.

<i>Pediastrum</i>	Factor altitud de origen		p valor
	Mayor altitud Ped4400	Menor altitud Ped3311	
Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$)	217.29	42.37	<0.0001

Cuadro 12: Valores promedio ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$) de la actividad antioxidante analizando el factor radiación ultravioleta en los cultivos de *Pediastrum*.

<i>Pediastrum</i>	Factor radiación ultravioleta		p valor
	-UVAB	+UVAB	
Actividad antioxidante ($\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$)	132.35	127.31	0.3840

d. Determinación de la actividad antioxidante del género *Chlamydomonas*

La altitud de origen y la exposición a la radiación UVAB en las cepas del género *Chlamydomonas*, tuvieron un efecto significativo para la formación de compuestos antioxidantes (Cuadro 13). Esto indica que tanto la altitud de origen y la exposición a los rayos UVAB son factores a tener en cuenta para poder potencializar la actividad antioxidante de cepas de este género, alcanzando un valor medio de 96.53 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ (Cuadro 14) para la cepa proveniente de mayor altitud (Chl4440). Al

exponer a los cultivos a una radiación de 4 mW/cm² se obtuvo un valor medio de 102.88 μmol trolox eq. g⁻¹ (Cuadro 15), no existiendo interacción entre los factores.

Cuadro 13: Valores promedio (μmol trolox eq. g⁻¹) de la actividad antioxidante por tratamiento en los cultivos de *Chlamydomonas*.

Tratamiento		Actividad antioxidante (μmol trolox eq. g ⁻¹)
Chl4440	-UV	87.45 a
	+UV	105.61 b
Chl3590	-UV	77.00 c
	+UV	100.15 d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05)

Cuadro 14: Valores promedio (μmol trolox eq. g⁻¹) de la actividad antioxidante analizando el factor altitud (msnm) de origen en los cultivos de *Chlamydomonas*.

<i>Chlamydomonas</i>	Factor altitud de origen		p valor
	Mayor altitud Chl4440	Menor altitud Chl3590	
Actividad antioxidante (μmol trolox eq. g ⁻¹)	96.53	88.58	0.0042

Cuadro 15: Valores promedio (μmol trolox eq. g⁻¹) de la actividad antioxidante analizando el factor radiación ultravioleta en los cultivos de *Chlamydomonas*.

<i>Chlamydomonas</i>	Factor radiación ultravioleta		p valor
	-UVAB	+UVAB	
Actividad antioxidante (μmol trolox eq. g ⁻¹)	82.23	102.88	<0.0001

4.4 DISCUSIÓN

Diferentes estudios han demostrado el efecto de la radiación ultravioleta en las microalgas, ocasionando efectos negativos en el crecimiento celular provocado por la inhibición de la fotosíntesis; como en el caso de las Chlorophytas *Stichococcus bacillaris* y *Chlorella* sp. (Copia et al., 2012; Hughes, 2006; Villafañe et al., 1999). Un estudio reciente demuestra que el tiempo y el nivel de la radiación puede ser letal

para los organismos fotosintéticos como la especie *Chlamydomonas reinhardtii* (Cheloni y Slaveykova, 2018). Pero también existen estudios que demuestran la capacidad de fotoadaptación, debido a un aumento de los niveles de compuestos antioxidantes (Jacob-Lopes et al., 2015; Pelegrín, 2001), sobre esto mismo existen trabajos que concluyen que existe una sensibilidad especie-específica en las microalgas (Cheloni y Slaveykova, 2018; Guan et al., 2011; Wong et al., 2007).

Las cepas del género *Pediastrum* evaluadas en este experimento mostraron una rápida respuesta adaptativa a la exposición de radiación UVAB (fotoadaptación), que se evidenció con un corto periodo de la fase de adaptación. Por otro lado, los cultivos del género *Chlamydomonas* expuestos a la radiación UVAB tuvieron un crecimiento similar a los cultivos no expuestos a la radiación. Esto puede deberse a que en su hábitat natural (zonas alto andinas) ambas cepas estudiadas están expuestas a altos niveles de radiación (Dejoux e Iltis, 1992; Vallejo, 2003), probablemente existiendo una adaptación evolutiva.

Un estudio realizado por Helbling et al., (1992), indica que el fitoplancton proveniente de bajas latitudes (zonas tropicales) no pierden la capacidad fotosintética frente a la radiación ultravioleta, generando la hipótesis de una adaptación evolutiva comparándolas con el fitoplancton de zonas polares. En este estudio se evidencia una mayor capacidad de adaptación de las cepas microalgales Ped4400 y Chl4440 provenientes de zonas alto andinas mayores a los 4000 msnm, mostrando una fase exponencial que alcanzó las mayores tasas de crecimientos ($\mu=0.66$ y $\mu=0.35$ respectivamente) respecto a las cepas provenientes de altitudes menores, complementándose con el estudio anteriormente mencionado.

Se ha determinado que el estrés producido por la radiación ultravioleta genera cambios en la composición bioquímica, como el incremento de compuestos fenólicos (polifenoles) en la biomasa de las microalgas Chlorophytas *Chlamydomonas nivalis*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella* sp., teniendo un papel importante en la

respuesta antioxidante (Copia et al., 2012; Duval et al., 2000; Kováčik et al., 2010); y en la acumulación del pigmento luteína como compuesto antioxidante asociada a la protección contra la fotoxidación en los géneros de Chlorophytas como *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Chlamydomonas*, *Spongiococcum* y *Scenedesmus* (Fernández et al., 2016; Mayorga et al., 2017; Shi et al., 2002).

En este trabajo, aunque no se determinó la producción de polifenoles y luteína, podría suponerse que existiría relación directa de estos compuestos con los altos valores de la actividad antioxidante, encontrada en las microalgas Chlorophytas del género *Pediastrum* y *Chlamydomonas*, sin embargo, en esta última se vio un incremento significativo en los cultivos expuestos a la radiación UV.

Goiris et al., (2012), determinaron una actividad antioxidante relativamente alta, mayor a los 40 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, utilizando el método del radical catión ABTS⁺ en extractos microalgales de Chlorophytas como las especies *Botryococcus braunii*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis suecica*. Por otro lado, en China se estudió la actividad antioxidante de plantas medicinales, frutos y vegetales nativos, donde obtuvieron valores promedios no mayores a los 7 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ (Cai et al., 2004). Al compararse estos valores con los obtenidos en el estudio para las diferentes microalgas, se evidencia el alto potencial antioxidante en estas.

Estudios realizados en Colombia por Contreras et al., (2011), evaluaron la actividad antioxidante de frutos nativos y semillas. Los resultados mostraron altos valores utilizando el método del radical catión ABTS⁺. Las curubas (*Passiflora tripartita*) (quiteña y criolla) y el marañón (*Anacardium occidentale*) fueron los frutos que mostraron los valores más altos (144, 131 y 115 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$), siendo superados por los obtenidos por las semillas de marañón, arazá (*Eugenia stipitata*) y algarrobo (*Hymenaea courbaril*), (1700, 440 y 428 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$). Comparado estos valores con los obtenidos con las microalgas alto andinas analizadas en este trabajo, se evidenció una actividad similar a la de los frutos, con valores entre los

100-230 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$; más aún los mayores valores lo obtuvieron las cepas microalgales Ped4400 y Chl4440 que provienen de mayor altitud.

El presente estudio da a conocer la alta actividad antioxidante en la microalga del género *Pediastrum*, alcanzando un valor máximo de 221.71 $\mu\text{mol trolox eq.g}^{-1}$, superando al del género *Chlamydomonas*, que alcanzó un valor de 87.45 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, valores referidos a las cepas provenientes de mayor altitud y no expuestas a radiación UV. Se puede inferir que esto se debe al alto contenido y calidad de los ácidos grasos polinsaturados (cadenas largas) que se encuentra presente en las microalgas del género *Pediastrum* (Anexo1) (Comentario de Flores, 2018), los que presentan propiedades antioxidantes (Michalak y Chojnacka, 2015), contraponiéndose con los encontrados en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, donde la presencia de estos ácidos grasos no alcanzan cadenas tan largas como en el *Pediastrum* (James et al., 2011).

Rao et al., (2006) al analizar la actividad antioxidante de la microalga *Botryococcus braunii* encontraron valores elevados al utilizar como solvente acetona, por lo que fue seleccionado para los análisis más detallados. Este resultado se dio al analizar los extractos obtenidos con acetona en las cepas del género *Chlamydomonas*. Sin embargo, para la cepa del género *Pediastrum* proveniente de la menor altitud (Ped3311), se evidenciaron los valores más bajos, lo que no ocurrió con la cepa proveniente de mayor altitud (Ped4400). Cabe destacar la alta eficiencia del solvente acetona para la extracción de polifenoles como los flavonoides (Huamán, 2014).

Se evidenció una marcada diferencia significativa en la respuesta antioxidante para el género *Pediastrum*. La cepa Ped3311 presentó un valor antioxidante de 42.99 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, mucho menor a la obtenida por la cepa Ped4400 que fue de 221.71 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, en los cultivos no expuestos a la radiación ultravioleta; similares resultados se obtuvieron en los cultivos sometidos a UV. Se podría inferir que la cepa proveniente de mayor altitud presentaría un mecanismo más desarrollado para la estimulación de la actividad antioxidante referido a la formación de flavonoides, es

así que trabajos realizados en plantas alpinas (Chávez et al., 1996), sugirieron que las concentraciones de estos antioxidantes se ven incrementadas con la altitud debido a la alta radiación que existe. Esta observación podría explicar porque las microalgas alto andinas provenientes de alturas mayores a los 4000 msnm estudiadas en este trabajo obtuvieron valores altos de actividad antioxidante, si se considera su metabolismo similar a las plantas superiores.

Más aún, en un estudio reciente se ha comprobado la diferencia significativa que existe en el contenido de luteína entre las cepas del género *Pediastrum*, encontrándose valores altos de este antioxidante en la cepa proveniente de mayor altitud (Ped4400) (Henriquez et al., 2017), superando las obtenidas en otros estudios de Chlorophytas del género *Scenedesmus* (Grima & Gabriel, 2006) y *Chlorella* (Shi et al., 2002).

En este orden de ideas, a través de este trabajo se puede decir que las microalgas alto andinas del género *Pediastrum* y *Chlamydomonas* provenientes del departamento de Ayacucho, de altitudes mayores a los 4,000msnm presentan una mayor actividad antioxidante que las provenientes de zonas inferiores, pudiendo considerarse como potencial fuente de origen natural de compuestos antioxidantes.

V. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones experimentales seguidas en esta investigación se concluye que:

- Se evidenció una fotoadaptación en el crecimiento de las microalgas *Pediastrum* sp. (Ped4400 y Ped3311) y *Chlamydomonas* sp. (Chl4440 y Chl3590) al ser expuestas a una radiación UVAB de 4 mW/cm².
- Las cepas microalgales de *Pediastrum* sp. (Ped4400) y *Chlamydomonas* sp. (Chl4440) provenientes de zonas alto andinas mayores a los 4000 msnm, mostraron mejores tasas de crecimiento ($\mu=0.66$ y $\mu=0.35$ respectivamente) y de actividad antioxidante que las de menor altitud (Ped3311 y Chl3590).
- La microalga *Pediastrum* sp. (Ped4400) evidenció el valor más alto de actividad antioxidante, de 221.71 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$ siendo no significativa la exposición a la radiación UVAB para este género, superando a la microalga *Chlamydomonas* sp (Chl4440) que alcanzó un valor de 105.61 $\mu\text{mol trolox eq. g}^{-1}$, para los cultivos expuestos a la radiación.
- Las cepas alto andinas del género *Pediastrum* y *Chlamydomonas* son potenciales fuentes naturales de compuestos antioxidantes.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio cualitativo-cuantitativo de los diferentes biocompuestos (pigmentos, lípidos y polifenoles) que puedan presentar estas microalgas alto andinas del género *Pediastrum* y *Chlamydomonas*.
- Realizar otros estudios para la microalga *Chlamydomonas* sp. (Chl4440) a radiaciones UV mayores y ver su relación con la concentración de antioxidantes, debido que presentó resultados significativos en el aumento de su actividad antioxidante.
- Se recomienda evaluar el uso como antioxidante de estas microalgas en la elaboración de alimento balanceado para la acuicultura, debido a su alto contenido en compuestos antioxidantes.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, RA. 2005. Algal Culturing Techniques. Academic Press, Amsterdam. 578 pp

ARREDONDO, B Y VOLTOLINA, D. 2007. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la Biomasa Microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas Del Noroeste, SC La Paz, BCS, ISBN 968.

BIDIGARE, RR; ONDRUSEK, ME; KENNICUTT, MC; ITURRIAGA, R., HARVEY, HR., HOHAM, RW., y MACKO, SA. 1993. Evidence a Photoprotective for Secondary Carotenoids of Snow Algae. *Journal of Phycology* 29(4): 427–434.

CÁCERES, S. 2009. Aislamiento y caracterización de las principales microalgas presentes en el sistema hidropónico del tipo raíz flotante. Tesis Ing. Santiago de Chile, Chile. Universidad de Chile. 57p

CAI, Y; LUO, Q; SUN, M; Y CORKE, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74(17): 2157–2184.

CARDOZO, K; GUARATINI, T; BARROS, M.P; FALCÃO, VR; TONON, AP; LOPES, NP y PINTO, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146: 60–78.

CASAL, C. 2010. Caracterización de la radiación ultravioleta en la provincia de Huelva e incidencia en la productividad y el valor biotecnológico de cultivos de interés comercial. Tesis Doc. España. Universidad de Huelva. 227p.

CHA, KH; KANG, SW; KIM, CY; UM, BH; NA, YR y PAN, CH. 2010. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8): 4756–4761.

CHÁVEZ, R; PLAZA, A y LOCK DE UGAZ, O. 1996. Antioxidante de origen vegetal. *Revista de Química* 10: 71–101.

CHELONI, G y SLAVEYKOVA, V. 2018. Photo-Oxidative Stress in Green Algae and Cyanobacteria Photo-oxidative stress in green algae and cyanobacteria. *Archive Ouverte UNGE* 5(14): 126–133.

CHEN, C; PEARSON, AM y GRAY, JI. 1992. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chemistry*, 43(3): 177–183.

CHLAMYDOMONAS COLLECTION, 2010. Chlamydomonas Connection, About Chlamydomonas. Consultado el 25 enero 2017. Disponible en: <http://www.chlamycollection.org/info.html>

CONTRERAS, J; CALDERÓN, L; GUERRA, E y GARCÍA, B. 2011. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International* 44(7): 2047–2053.

COPIA, J; GAETE, H; ZUNIGA, G; HIDALGO, M y CABRERA, E. 2012. Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp. *Latin American Journal of Aquatic Research* 40(1): 113–123.

DÍAZ, K. 2012. Biotecnología de microalgas como fuente de diversos compuestos de interés para la industria farmacéutica y alimentaria. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica* 19(Supl, 2): 46–48.

DUVAL, B; SHETTY, K y THOMAS, WH. 2000. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *Journal of Applied Phycology* 11(6): 559–566.

ESTEVEZ, MS; MALANGA, G y PUNTARULO, S. 2001. UV-B effects on Antarctic *Chlorella* sp cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62(1–2): 19–25.

FORJÁN, E; GARBAYO, I; HENRIQUES, M; ROCHA, J; VEGA, JM y VÍLCHEZ,

C. 2011. UV-A Mediated Modulation of Photosynthetic Efficiency, Xanthophyll Cycle and Fatty Acid Production of *Nannochloropsis*. *Marine Biotechnology* 13(3): 366–375.

GOIRIS, K; MUYLAERT, K; FRAEYE, I; FOUBERT, I; DE BRABANTER, J y DE COOMAN, L. 2012. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal of Applied Phycology* 24(6): 1477–1486.

GOMEZ, A; LOPEZ, J; RODRIGUEZ, A; FORTIZ, J; MARTINEZ, L; APOLINAR, A y ENRIQUEZ, L. 2016. Produccion de compuestos fenolicos por cuatro especies de microalgas marinas sometidas a diferentes condiciones de iluminacion. *Latin American Journal of Aquatic Research* 44(1): 137–143.

GONZÁLES, A. (2015). ¿Qué Son Las Microalgas? Interés Y Uso. *Cajamar* 11: 1–11.

GRIMA, M y GABRIEL, F. 2006. Nueva especie de microalga y su aplicación para consumo animal, humano y en la obtención de carotenoides.

GROBBELAAR, JU. 2004. Algal Nutrition Mineral, *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. 95-115.

GUAMÁN, M y GONZÁLEZ, N. 2016. Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de Agua Dulce del Ecuador. *Corporación Para La Investigación Energética* 143.

GUAN, WC; LI, P; JIAN, JB; WANG, JY y LU, SH. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on photochemical efficiency of *Chaetoceros curvisetus* (Bacillariophyceae). *Acta Physiologiae Plantarum* 33(3): 979–986.

HAJIMAHMOODI, M; FARAMARZI, MA; MOHAMMADI, N; SOLTANI, N; OVEISI, MR y NAFISSI-VARCHEH, N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal of Applied Phycology* 22: 43–45.

HARRIS, EH. 2001. *Chlamydomonas* as a model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 52: 363–406.

HELBLING, EW; VILLAFANE, V; FERRARIO, M; HOLM-HANSEN, O. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80: 89–100.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A y LABBÉ, JI. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49(2): 157–173.

HENRIQUEZ, JA; TENORIO, LC; FLORES, L; RUIZ, A y AGUILAR; C. 2017. Evaluación de Pigmentos en el género *Pediastrum* provenientes de zonas alto andinas expuestas a la radiación UV. Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, Instituto del Mar del Perú. Poster Congreso Internacional de Biotecnología algal. Lima, Perú.

HERRERO, M; CIFUENTES, A y IBANEZ, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry* 98(1): 136–148.

HU, CC; LIN, JT; LU, FJ; CHOU, FP y YANG, DJ. 2008. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. *Food Chemistry* 109(2): 439–446.

HUAMÁN, M. 2014. Evaluación del efecto de tratamientos con solventes orgánicos, agua y el tiempo de extracción en el rendimiento de polifenoles totales de la harina de semilla de palta (*Persea americana*). Tesis Ing. Huancayo, Perú. Universidad Nacional del Centro del Perú. 95p.

HUGHES, KA. 2006. Solar UV-B radiation, associated with ozone depletion, inhibits the Antarctic terrestrial microalga, *Stichococcus bacillaris*. *Polar Biology* 29(4): 327–336.

HUN ARENAS, YC. 2010. Efecto de la concentración de la solución nutritiva sobre la biomasa de microalgas del género *Chlamydomonas*. Tesis Ing. Santiago de Chile, Chile. Universidad de Chile. 45p.

JACOB-LOPES, E; QUEIROZ, Z; RAGAGNIN DE MENEZES, C y Ramírez-

Mérida, G. 2015. Microalgas : potencial para la producción de compuestos bioactivos nanoencapsulados. *Ciencia Natura* 37: 7–17.

JAÉN, A y FERNANDEZ, J. 1985. Efecto de la temperatura e intensidad luminosa sobre el crecimiento y actividad fotosintética del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Junta de energía nuclear. Madrid, España. 104p.

JAIME, L; MENDIOLA, JA; IBÁÑEZ, E; MARTIN-ÁLVAREZ, PJ; CIFUENTES, A; REGLERO, G y SEÑORÁNS, FJ. 2007. β -Carotene isomer composition of sub- and supercritical carbon dioxide extracts. Antioxidant activity measurement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(26): 10585–10590.

JAMES, GO; HOCART, CH; HILLIER, W; CHEN, H; KORDBACHEH, F; PRICE, GD y DJORDJEVIC, MA. 2011. Fatty acid profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* under nitrogen deprivation. *Bioresource Technology* 102(3): 3343–3351.

KOVÁČIK, J; KLEJDUS, B y BAČKOR, M. 2010. Physiological responses of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) to UV-A and UV-C light. *Photochemistry and Photobiology* 86(3): 612–616.

LARCHER, W. 1995. *Physiological Plant Ecology*. Springer, Berlin. 506 p

FLORES, L. 2018. Comentario de Análisis de ácidos grasos de la microalga del género *Pediastrum*. Laboratorio de análisis instrumental, Instituto del Mar del Perú.

LI, HB; CHENG, KW; WONG, CC; FAN, KW; CHEN, F y JIANG, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry* 102(3): 771–776.

LUBIÁN, L y CAÑAVATE, J. 2001. Obtención de biomasa concentrada de microalgas marinas para su utilización como alimento larvario de especies marinas. *Pesca Y Acuicultura, Serie Acuicultura*. Sevilla, España. 50p.

MANRIQUE, E. (2003). Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis. *Ecosistemas*. Asociación española de ecología terrestre. España 12p.

MARTÍNEZ GARCÍA, L. 2012. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Universidad de León.

MAYORGA, C; MURILLO, E y MANSO, L. 2017. Luteína y β -caroteno como principales antioxidantes acumulados en la microalga *Dunaliella salina*. *Prisma Tecnológico* 8(1): 34–38.

MIAO, X y WU, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology* 97(6): 841–846.

MICHALAK, I y CHOJNACKA, K. 2015. Algae as production systems of bioactive compounds. *Engineering in Life Sciences* 15(2): 160-176.

MILLINGTON, W., & GAWLIK, S. (1967). Silica in the wall of *Pediastrum*. *Nature* 216(5110): 68.

MORONTA, R; MORALES, E y MORA, R. 2006. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Rev. Facultad Agronomía* 23(1): 27–41.

OZER, B; ERKAYA, A; UDOH, A; DUYGU, Y; AKBULUT, A; BAYRAMOGLU, G y ARICA, Y. 2012. Biosorption of Cr(VI) by free and immobilized *Pediastrum boryanum* biomass: Equilibrium, kinetic, and thermodynamic studies. *Environmental Science and Pollution Research* 19(7): 2983–2993.

PALACIOS, D. (2016). Efecto de los espectros de luz azul, roja y verde en la multiplicación celular y síntesis bioquímica de *Rhodomonas* spp. Y *Tetraselmis* spp. en condiciones in vitro. Pontificia Universidad Javeriana. Tesis Blg. Guayaquil, Ecuador. Universidad de Guayaquil. 77p.

PARK, J; CRAGGS, RJ y SHILTON, AN. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1): 35–42.

PELEGRÍN, Y. 2001. Algas en la botica. *Avance Y Perspectiva* 20: 283–292.

PLAZA DEL MORAL, M. 2010. Búsqueda de nuevos ingredientes funcionales

naturales procedentes de algas. Tesis Doc. Universidad Autónoma de Madrid. España. 371p.

QUEVEDO, C; MORALES, S y ACOSTA, A. 2008. Crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae Rev. de la Facultad de Química Farmacéutica* 15: 25–31.

RAO, AR; SARADA, R; BASKARAN, V y RAVISHANKAR, GA. 2006. Antioxidant activity of *Botryococcus braunii* extract elucidated in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(13): 4593–4599.

RE, R; PELLEGRINI, N; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A; YANG, M y RICE-EVANS, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9): 1231–1237.

RIVERO, A. 2016. Análisis físico-químico del agua de la Dársena del río Guadalquivir. Universidad Pablo de Olavide. Sevilla, España. 5p.

ROMO, A. 2002. Manual para el cultivo de microalgas. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 65p.

SÁNCHEZ-ESTUDILLO, L. 2011. Alimento nutritivo, colorido y en movimiento : Los cultivos de apoyo en Acuicultura. *Ciencia y Mar* 43(1): 55–60.

SENAMHI. (2017). Pronóstico de Radiación UV máximo. Consultado el 23 febrero 2017. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe/?p=0420>

SHI, XM; JIANG, Y y CHEN, F. 2002. High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotechnology Progress* 18(4); 723–727.

TAÍZ and ZEIGER. 2006. Photosynthesis: Physiological and Ecological Considerations. *Plant Physiology* 4(9): 171–192.

TUTIN, TG. 1940. The algae. *Transactions of the Linnean Society of London: 3rd Series* 1(2); 191–202.

VALLEJO, L. 2003. Índice Ultravioleta. Universidad de Antofagasta. Chile. 72p.

VILLAFañE, VE; ANDRADE, M; LAIRANA, V; ZARATTI, F y HELBLING, EW. 1999. Inhibition of phytoplankton photosynthesis by solar ultraviolet radiation: Studies in Lake Titicaca, Bolivia. *Freshwater Biology* 42(2): 215–224.

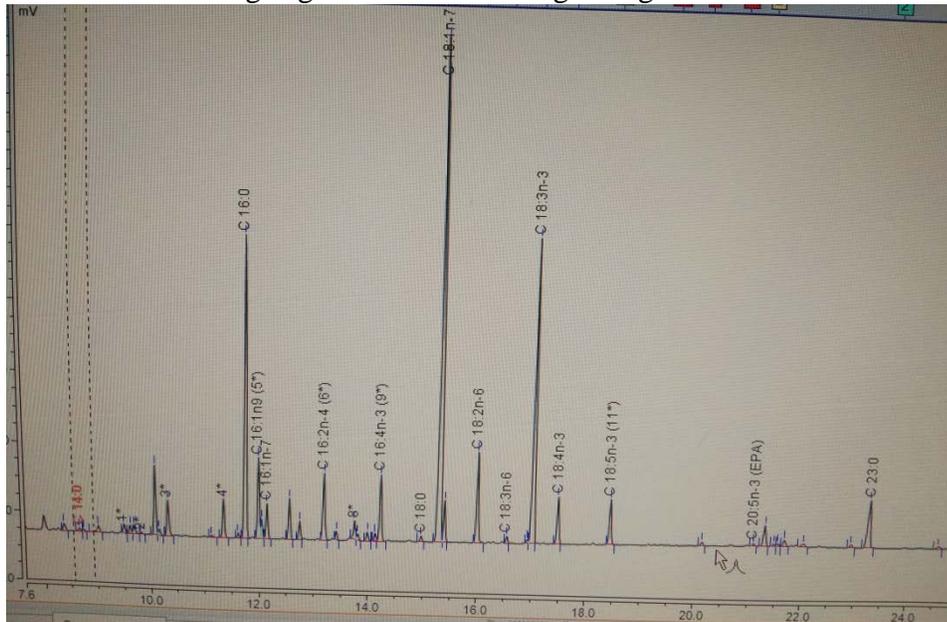
WANG, L; PAN, B; SHENG, J; XU, J; y HU, Q. 2007. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chemistry* 105(1): 36–41.

WONG, CY; CHU, WL; MARCHANT, H y PHANG, SM. 2007. Comparing the response of Antarctic, tropical and temperate microalgae to ultraviolet radiation (UVR) stress. *Journal of Applied Phycology* 19(6): 689–699.

YONG, Y y LEE, Y. 1991. Do carotenoids play a photoprotective role in the cytoplasm of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Phycologia* 30(3): 257–261.

ANEXO

Anexo 1: Análisis de ácidos grasos de la microalga del género *Pediastrum*.

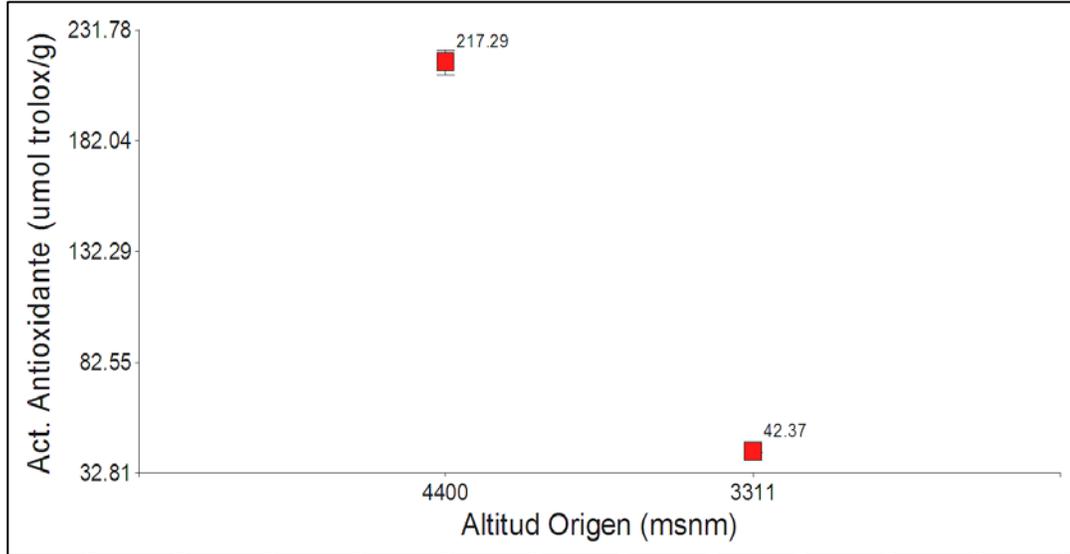


Anexo 2: Medias ajustadas de actividad antioxidante y errores estándares para factor altitud de origen de las microalgas del género *Pediastrum*.

ALTITUD.ORIGEN	Medias	E. E.	
4400	217.29	5.45	A (IMP-BG 288)
3311	42.37	0.52	B (IMP-BG 255)

LSD Fisher (Alfa=0.05), Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 3: Actividad antioxidante del género *Pediastrum* provenientes de zonas alto andinas.

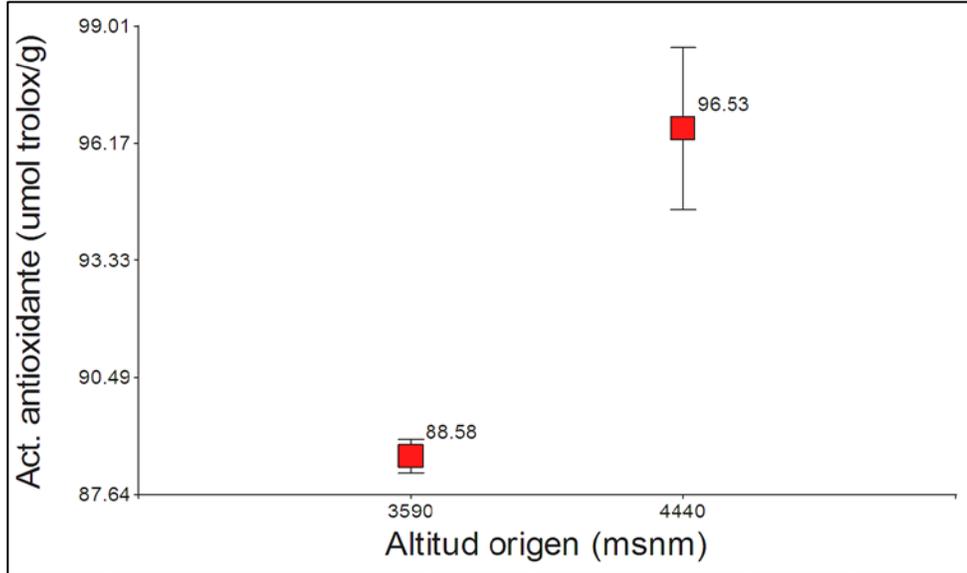


Anexo 4: Actividad antioxidante, medias ajustadas y errores estándares para factor altitud de origen de las microalgas del género *Chlamydomonas*.

ALTITUD.ORIGEN	Medias	E.E.		
4440	96.53	1.97	A	(IMP-BG 277)
3590	88.58	0.41	B	(IMP-BG 294)

LSD Fisher (Alfa=0.05), Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5: Actividad antioxidante del género *Chlamydomonas* provenientes de zonas alto andinas.



Anexo 6: Actividad antioxidante, medias ajustadas y errores estándares para factor radiación de las microalgas del género *Chlamydomonas*.

RADIACION	Medias	E.E.	
4	102.88	1.26	A
0	82.23	1.56	B

LSD Fisher (Alfa=0.05), Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7: Actividad antioxidante del género *Chlamydomonas* expuestas a radiación ultravioleta.

