

Universidad Católica de Santa María.

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas.
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica.



“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LA MICROALGA *Haematococcus pluvialis*, POR EL ENSAYO ORAC_{FL} EN EL LECTOR DE PLACAS VARIOSKAN LUX”.

Tesis presentada por el Bachiller:

Johnson Corrales, Fabrizioo.

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo.

Asesora: Maestro Paredes Fuentes, Julitza.

Arequipa - Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000018298
N° Trámite en Fac. 334-2017
Fecha Recep. Fac. 11-04-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **JOHNSON CORRALES, Fabrizio**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE MICROALGAS POR EL ENSAYO ORAC_{FL} ADAPTADO AL TERMOCICLADOR MASTERCYCLER REALPLEX"

DICTAMINADORES: 1) **Ing. Eugenia Zeballos Delgado** 2) **Mgter. Fredy Molina Rodríguez**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente
FIRMAS:  (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA **17.04.17**

ASESOR: **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"EVALUACION DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE LA MICROALGA Haematococcus pluvialis"**, POR EL ENSAYO ORAC_{FL} EN EL LECTOR DE PLACAS VARIOSKAN LUX", considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

FIRMA  FECHA **19-12-2018**

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- | | |
|---|--|
| 1) Ing. Eugenia Zeballos Delgado | 3) Ing. Cinthia Córdova Barrios |
| 2) Dr. Fredy Molina Rodríguez | |

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: **"EVALUACION DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA MICROALGA Haematococcus pluvialis, POR EL ENSAYO ORAC_{FL} EN EL LECTOR DE PLACAS VARIOSKAN LUX"** y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente
FIRMA  (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA **28.12.18**

JURADOS: PRESIDENTE **ING. EUGENIA ZEBALLOS DELGADO**
VOCAL **DR. FREDDY MOLINA RODRIGUEZ**
SECRETARIO **ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS**

FECHA **14/1/19** HORA **19.00** LOCAL **C-402**

FIRMA DEL DECANO

FECHA



Dedicatoria.

Porque todos necesitamos una fuerza originaria y una razón para hacer que nuestras acciones se conviertan en trascendentales, este trabajo se lo dedico a Dios, por ser mi fuerza y soporte; a la ciencia por ser la razón por la que día a día me encuentro decidido a investigar y a todas las personas que me brindaron su apoyo incondicional y nunca dudaron de la importancia de este trabajo.



Agradecimientos.

Al doctor José Villanueva Salas por su incondicional apoyo y confianza desde el inicio de este trabajo hasta el final de este, a la maestra Julitza Paredes por su paciencia y apoyo constante, y a los integrantes de los laboratorios: Proyecto Mercurio y Neurociencia y biología molecular de la UCSM.

A mi mamá y hermana por nunca dejar que me rindiera, apoyarme en todo momento y por su infinito amor, a mis abuelos, Juan y Nilda por ser un ejemplo vivo para mí, a mi tía Verónica Corrales y familia por haberme respaldado siempre sin dudar y darme todo su cariño, y a mi tía Verónica Valdez y familia por estar siempre pendientes de mí y de la realización de esta tesis.

A María Belén Ortiz por darme siempre su apoyo, sustento y cariño, a mis amigos Juan Diego Tejada, Camilo Febres, Carlos Murillo, Cesar del Carpio, Paolo Velazco, Nazareth Carigga y Gretta Suarez por siempre estar dispuestos a ayudarme.

Al doctor Jaime Cárdenas, al ingeniero Edilberto Medina de la TUM y a la doctora Graciela Pavon-Djavid de la Universidad de Paris XIII, por sus consejos que ayudaron a agilizar este trabajo.

A los señores Carlos Callo y Marcos Vargas, a las señoritas Andrea Céspedes y Roció Rodríguez y señoras Luisa del Carpio y Sofia Herrera, por facilitar mi trabajo en los laboratorios.

Y finalmente al doctor Freddy Molina, a la ingeniera Eugenia Zevallos y a la ingeniera Cinthia Córdova por su tiempo y respaldo a este trabajo de investigación.

Epígrafe.



“Esfuézate y se valiente...que Yo...

el Señor tu Dios estará contigo”

Josué 1:9

Índice de Contenidos.

Índice de Contenidos.....	IV
Índice de Figuras.	VIII
Índice de Tablas.	XI
Listado de abreviaturas	XII
Resumen.....	XIV
Abstract	XVI
Introducción.	1
Objetivos.	4
Hipótesis.....	5
Marco Teórico.....	6
1.1 Estrés Oxidativo.	6
1.1.1 Especies reactivas de oxígeno como mediadores del daño celular.	7
1.1.1.1 Daño en el ADN	7
1.1.2 Especies reactivas de oxígeno como factores para el desarrollo de enfermedades.	7
1.1.2.1 Enfermedades cardiovasculares.....	9
1.1.2.1.1 Hipertensión.	9
1.1.2.2 Síndrome Metabólico y Diabetes.....	9
1.1.2.3 Enfermedades neurodegenerativas	10
1.1.2.3.1 Enfermedad de Alzheimer.....	10
1.1.2.3.2 Enfermedad de Parkinson.....	10
1.1.2.4 Preeclampsia	10
1.1.2.5 Glaucoma.....	10
1.1.2.6 Envejecimiento.	11
1.1.2.7 Daño renal.....	11
1.2 Antioxidantes.....	12
1.2.1 Antioxidantes rompedores de cadena.....	12
1.2.2 Antioxidantes en la naturaleza.	13
1.3 ORAC.....	14
1.4 ORAC-LIPO.....	16
1.5 Termociclador.....	17
1.6 Lector de placas: Varioskan LUX	18
1.7 <i>Haematococcus pluvialis</i>	18

1.7.1	Taxonomía y ocurrencia.....	20
1.7.2	Morfología celular y ciclo de vida.	20
1.7.3	<i>Haematococcus pluvialis</i> como fuente principal de astaxantina.....	22
1.7.4	Biosíntesis de astaxantina en <i>H. pluvialis</i>	22
1.7.5	Condiciones de cultivo y requisitos para el crecimiento celular y la formación de astaxantina.	24
1.8	Fotobiorreactores.....	26
Materiales y métodos.		28
2.1	Lugar de ejecución.	28
2.2	Materiales.	28
2.2.2	Biológicos.	29
2.2.3	Equipos.....	29
2.2.4	Vidrio.	29
2.2.5	Otros.....	30
2.3	Métodos.	31
2.3.1	Diseño de los fotobiorreactores “air-lift”.....	31
2.3.2	Ensayo ORAC.....	32
2.3.2.1	Preparación de stocks y reactivos.	32
2.3.2.1.1	Preparación del buffer fosfato.	32
2.3.2.1.2	Preparación de solución stock de fluoresceína sódica.....	33
2.3.2.1.3	Preparación de solución stock de Trolox.	33
2.3.2.2	Evaluación de la capacidad antioxidante de muestras hidrofílicas (ORAC-H).....	33
2.3.2.3	Evaluación de la capacidad antioxidante de muestras lipofílicas (ORAC-L).	35
2.3.3	Construcción de los fotobiorreactores “air-lift”.....	36
2.3.4	Cultivo de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	37
2.3.4.1	Preparación del medio BG11.....	37
2.3.4.2	Preparación de la cepa.	39
2.3.4.2.1	Aislamiento de la cepa.	39
2.3.4.2.2	Obtención de quistes de <i>Haematococcus pluvialis</i>	40
2.3.4.3	Funcionamiento de los biorreactores.	41
2.3.4.4	Curva de crecimiento.	42
2.3.5	Obtención de extractos.....	45

2.3.5.1	Separación de la biomasa.....	45
2.3.5.2	Obtención de extractos a partir de células secas de <i>Haematococcus pluvialis</i> . 47	
2.3.5.2.1	Extracto con acetato de etilo – etanol.....	47
2.3.5.2.2	Extracto con acetona.	47
2.3.5.2.3	Extracto con dimetilsulfóxido.	47
2.3.6	Preparación del equipo.....	49
2.3.7	Pruebas preliminares.	51
2.3.7.1	Ensayo ORAC en el termociclador para PCR en tiempo real Realplex ² .51	
2.3.7.2	Ensayo ORAC en el lector de placas Varioskan LUX.	51
2.3.7.3	Ensayo ORAC-L para el BHA.....	52
2.3.7.4	Pruebas preliminares de ensayo ORAC-L de diferentes extractos antioxidantes de <i>Haematococcus pluvialis</i>	52
2.3.8	Ensayo ORAC-H de extractos con DMSO de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> y de microalgas obtenidas en los fotobiorreactores... 52	
2.3.9	Ensayo ORAC-L de extractos con DMSO de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> y de microalgas obtenidas en los fotobiorreactores... 52	
	Resultados y Discusión.	53
3.1	Diseño de los fotobiorreactores “air lift”.....	53
3.2	Curva de crecimiento después del uso de los fotobiorreactores.....	53
3.3	Aislamiento de la cepa de <i>Haematococcus pluvialis</i> y obtención de quistes. 60	
3.4	Obtención de extractos.	60
3.5	Pruebas preliminares.	61
3.5.1	Ensayo ORAC en el termociclador Realplex ²	61
3.5.2	Ensayo ORAC en el lector de placas Varioskan LUX.....	63
3.5.3	Ensayo ORAC para el BHA.....	66
3.5.4	Ensayo ORAC de extractos obtenidos	68
3.6	Ensayo ORAC-H y ORAC-L de extractos de microalgas con DMSO.	72
3.7	Análisis de datos obtenidos.	75
3.8	Límites de detección.....	78
	Conclusiones	82
	Recomendaciones.....	84
	Referencias Bibliográficas.	85

Anexos	93
--------------	----



Índice de Figuras.

Figura 1: Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (10).....	8
Figura 2: Ciclo de vida del <i>Haematococcus pluvialis</i> (1).....	21
Figura 3: Estadios en los ciclos de vida del <i>Haematococcus pluvialis</i> (1).	21
Figura 4: Biosíntesis de Astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i> (1).....	23
Figura 5: Alícuotas de stocks de Fluoresceína.....	33
Figura 6: Fotobiorreactor construido.	37
Figura 7: Preparación de medio BG-11 sólido.....	39
Figura 8: Vista microscópica de muestra inicial de la cepa <i>H. pluvialis</i>	40
Figura 9: (a) Primeros días de cultivo de la microalga <i>H. pluvialis</i> en medio sólido modificado, nótese el color verde de las cepas. (b) Mismos cultivos, 2 semanas después, nótese el color rojo de las cepas.	41
Figura 10: Funcionamiento de los fotobiorreactores construidos al simultaneo.....	42
Figura 11: Tubos Eppendorf con muestras diarias colocadas en orden de acuerdo con el día de muestreo.....	44
Figura 12: Foto de los fotobiorreactores en uso y al momento de muestreo para realizar las curvas de crecimiento.	45
Figura 13: Foto de las colonias suspendidas en agua destilada estéril listas para ser centrifugadas y luego secadas en una estufa.	46
Figura 14: Células secas de la microalga <i>H. pluvialis</i>	46
Figura 15: Extracto obtenido utilizando la mezcla de acetato de etilo y etanol, nótese el color naranja leve.	48
Figura 16: Extracto obtenido con DMSO, nótese el color rojo intenso obtenido.	48
Figura 17: Extractos obtenidos con DMSO, a partir de las microalgas recolectadas luego del uso de los fotobiorreactores.....	49
Figura 18: Lector de placas Varioskan LUX.	51
Figura 19: Diferentes vistas del diseño del fotobiorreactor a construir (elaboración propia).	53
Figura 20: Curva de crecimiento obtenida por conteo celular después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.	55
Figura 21: Tasa de crecimiento de la curva de crecimiento obtenida por conteo celular.	56
Figura 22: Curva de crecimiento obtenida por medición de absorbancia (688 nm) después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.	57
Figura 23: Tasa de crecimiento de la curva de crecimiento obtenida por medición de absorbancia.....	58
Figura 24: Curva de crecimiento obtenida por pesaje de biomasa seca después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.	59
Figura 25: Curvas de estándares y blancos de Trolox para el ensayo ORAC (60 minutos), realizado en el termociclador Realplex2.....	62
Figura 26: Curvas de estándares y blancos de Trolox para el ensayo ORAC (90 minutos), realizado en el termociclador Realplex2.....	62

Figura 27: Curvas obtenidas del ensayo ORAC-H de la prueba preliminar 29.08.18.	63
Figura 28: Curvas obtenidas del ensayo ORAC-H de la prueba preliminar con muestras de Campari (curva roja), vino (curva azul) y jugo de naranja (curva naranja).	64
Figura 29: Recta de relación entre concentraciones de Trolox y áreas bajo la curva. En la recta también se ubican los puntos obtenidos por las áreas generadas por las muestras trabajadas.	65
Figura 30: Resultados de la prueba preliminar para el ensayo ORAC-L con dos muestras de BHA diluidas 1:50 y 1:100.	67
Figura 31: Recta de relación entre las AUC obtenidas y las concentraciones de Trolox empleadas, para la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con muestras diluidas de BHA.	67
Figura 32: Gráfico del ensayo ORAC-L donde se buscó evaluar la capacidad antioxidante del extracto obtenido con acetona - acetato de etilo de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	69
Figura 33: Gráfico del ensayo ORAC-L donde se buscó evaluar la capacidad antioxidante del extracto de la microalga <i>H. pluvialis</i> obtenido con acetona.	70
Figura 34: Gráfico del ensayo ORAC-L obtenido de las muestras diluidas 1:3 (línea azul) y 1:5 (línea roja) y de una muestra no diluida (línea naranja) del extracto de la microalga <i>H. pluvialis</i> con DMSO.	71
Figura 35: Recta de relación entre las AUC obtenidas y las concentraciones de Trolox empleadas, para la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con muestras de extractos obtenidos con DMSO.	71
Figura 36: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 29.08.18.	93
Figura 37: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 15.10.18.	93
Figura 38: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 23.10.18.	94
Figura 39: Gráfico del ensayo ORAC-L 06.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	95
Figura 40: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 06.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	95
Figura 41: Gráfico del ensayo ORAC-L 07.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	96
Figura 42: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 07.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	96
Figura 43: Gráfico del ensayo ORAC-L 09.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	97
Figura 44: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 09.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	97

Figura 45: Gráfico del ensayo ORAC-L 12.11.18 donde se trabajó con una muestra diluida 1:5 y 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	98
Figura 46: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 12.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	98
Figura 47: Gráfico del ensayo ORAC-L 13.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	99
Figura 48: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 13.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	99
Figura 49: Gráfico del ensayo ORAC-L 14.11.18 donde se trabajó con una muestra diluida 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	100
Figura 50: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 14.11.18, puntos rojos: estándares, punto gris: muestra.	100
Figura 51: Gráfico del ensayo ORAC-L 19.11.18 donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.	101
Figura 52: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 19.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	101
Figura 53: Gráfico del ensayo ORAC-L 20.11.18 donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.	102
Figura 54: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 20.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	102
Figura 55: Gráfico del ensayo ORAC-H 21.11.18 (a) donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> .	103
Figura 56: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-H 21.11.18 (a), puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.	103
Figura 57: Gráfico del ensayo ORAC-H 21.11.18 (b) donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.	104
Figura 58: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-H 21.11.18 (b), puntos rojos: estándares, punto gris: muestra.	104

Índice de Tablas.

Tabla 1: Procedimiento para el cargado de pocillos en la placa de lectura para el ensayo ORAC.....	35
Tabla 2: Tabla en la que se describe las principales diferencias entre los equipos: Realplex2 y Varioskan LUX al momento de desarrollar un ensayo ORAC.....	64
Tabla 3: Resultados obtenidos de la prueba preliminar del ensayo ORAC-H con muestras de naranja, vino y Campari.	65
Tabla 4: Resultados obtenidos en la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con BHA.	68
Tabla 5: Resultados obtenidos en la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con los extractos obtenidos con DMSO.	72
Tabla 6: Resultados obtenidos (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 del extracto obtenido con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> . DS: Desviación estándar y CV: coeficiente de variación.....	73
Tabla 7: Resultados obtenidos del ensayo ORAC-L (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 del extracto obtenido con DMSO de microalgas obtenidas en fotobiorreactores (microalgas verdes).....	74
Tabla 8: Resultados obtenidos para el ensayo ORAC-H (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga <i>H. pluvialis</i> (extracto 1) y de microalgas de los fotobiorreactores (extracto 2).....	74
Tabla 9: Resultados en equivalentes Trolox por cada mililitro de extracto, la sección roja corresponde al extracto obtenido con células de <i>H. pluvialis</i> (ORAC-L), la sección verde al extracto obtenido con microalgas (ORAC-L) y la sección azul al ORAC-H.	74
Tabla 10: Datos a ser analizados con la prueba ANOVA.....	75
Tabla 11: Prueba ANOVA, realizada en Microsoft Excel.....	76
Tabla 12: Prueba Tukey para datos obtenidos (95 % de confiabilidad).	77
Tabla 13: Análisis y procesamiento de datos obtenidos en el ensayo 6.11.18 para la obtención del límite de detección. Las expresiones $\bar{x}$ y $\bar{y}$ son los promedios respectivos de cada columna x_i y y_i respectivamente. La expresión y_i son los valores “y” pero recalculados con la ecuación de la recta obtenida.	80
Tabla 14: Límites de detección (μM Trolox) de los ensayos ORAC realizados.	81

Listado de abreviaturas

ORAC: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno.

ORAC-H: ORAC para antioxidantes hidrofílicos.

ORAC-L: ORAC para antioxidantes lipofílicos.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EP: Enfermedad de Parkinson.

SOD: Superóxido dismutasa.

HAT: Transferencia de átomos de hidrogeno.

SET: Transferencia electrónica simple.

AAPH: 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro.

CD: Ciclodextrinas.

RMCD: Ciclodextrina metilada aleatoriamente.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

TAG: Triacilgliceroles.

MEP o DOXP: Ruta del no mevalonato.

IPP: Pirofosfato de isopentenilo.

DMAPP: Dimetilalil difosfato.

HDR: 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa.

GGPS: Geranilgeranil pirofosfato sintasa.

GGPP: Geranilgeranil pirofosfato.

PYS: Fitoeno sintasa.

PDS: Fitoeno desaturasa.

ZDS: ζ -caroteno desaturasa.

LCY: Licopeno ciclasas.

BKT: β -caroteno cetolasa.

CrtR-b: β -caroteno hidroxilasa.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

BHA: Hidroxibutilanol.

HP: *Head Plate*.



Resumen.

El ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno, más conocido como ORAC, es un método para hallar la capacidad antioxidante de extractos y sustancias, el cual expresa sus resultados en equivalentes Trolox. La astaxantina es uno de los antioxidantes más potentes conocidos actualmente, y la microalga *Haematococcus pluvialis* es capaz de sintetizar este antioxidante en situaciones de estrés. El interés biotecnológico por el cultivo de esta microalga en los últimos años ha aumentado, y se han generado diversas técnicas de cultivo, así como distintos tipos de fotobiorreactores para su crecimiento, y todo esto debido al antioxidante que es capaz de sintetizar, el cual es muy bien cotizado en el mercado de los antioxidantes (aprox.: \$3000/kg de astaxantina)(1).

En la primera parte del presente trabajo de investigación se diseñaron y se construyeron, 3 fotobiorreactores air-lift, en los cuales se cultivó una cepa de microalgas, que a la descripción microscópica coincidió con el género *Scenedesmus* y *Chlorella vulgaris*. En una segunda parte se procedió a purificar y cultivar la cepa de la microalga *Haematococcus pluvialis*, en medios sólidos modificados para poder inducir al estrés a esta microalga, obteniendo colonias de esta cepa estresada.

Luego se buscó comparar el funcionamiento del equipo Realplex² y Varioskan LUX para realizar el ensayo ORAC, para luego medir la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos utilizando una modificación del ensayo ORAC, denominado ORAC-L, el cual utiliza una molécula llamada β -ciclodextrina metilada, para solubilizar antioxidantes lipofílicos.

La capacidad antioxidante utilizando el ensayo ORAC-L, de los extractos obtenidos en promedio fueron: para la muestra de extracto de la microalga *H. pluvialis*: 9690.00

eq. Trolox (μM)/ mL, para la muestra de extractos de microalgas obtenidas en los fotobiorreactores: 5213.33 eq. Trolox (μM)/ mL; en ambos casos se utilizó dimetilsulfóxido como solvente, y para el ensayo ORAC-H del extracto de la microalga *H. pluvialis*: 2987.33 eq. Trolox (μM)/ mL. Estos valores respaldan finalmente la hipótesis en la cual se planteaba obtener extractos antioxidantes a partir de la microalga *H. pluvialis*.

Palabras clave: ORAC, *Haematococcus pluvialis*, Fotobiorreactores, Capacidad antioxidante.



Abstract

The oxygen radical absorbance capacity assay, better known as ORAC, is a method to find the antioxidant capacity of extracts and substances, which expresses its results in Trolox equivalents. Astaxanthin is one of the most potent antioxidants currently known, and the microalga, *Haematococcus pluvialis*, can synthesize this antioxidant in stress situations. The biotechnological interest in the cultivation of this microalga has increased in the recent years, and various cultivation techniques have been generated, as well as different types of photobioreactors for its growth, and all this due to the antioxidant that can synthesize, which is very well valued in the antioxidant market (approx.: \$ 3000 / kg of astaxanthin) (1).

In the first part of this research work, 3 air-lift photobioreactors were designed and constructed, in these photobioreactors, a strain of microalgae was cultivated, which coincided in the microscopic description, with the sort: *Scenedesmus* and *Chlorella vulgaris*. In a second part, the strain of the microalga *Haematococcus Pluvialis* was isolated and cultivated in modified solid media to induce stress, obtaining colonies of this stressed strain.

Then it was compared the performance of the Realplex2 and Varioskan LUX equipment to perform the ORAC assay, to then measure the antioxidant capacity of the extracts obtained using a modification of the ORAC assay, called ORAC-L, which uses a molecule called methylated β -cyclodextrin, to solubilize lipophilic antioxidants.

The antioxidant capacity using the ORAC-L assay, of the extracts obtained on average were: for the sample of the microalga *H. pluvialis*: 9690.00 eq. Trolox (μM) / mL, for the sample of microalgae extracts obtained in the photobioreactors: 5213.33 eq. Trolox (μM) / mL; in both cases dimethyl sulfoxide was used as a solvent, and for the ORAC-H assay of the extract of the microalga *H. pluvialis*: 2987.33 eq. Trolox (μM) / mL. These values finally support the hypothesis in which it was proposed to obtain antioxidant extracts from the microalga *H. pluvialis*.

Key words: ORAC, *Haematococcus pluvialis*, Photobioreactors, Antioxidant capacity.

Introducción.

Hoy en día existe un creciente interés por investigar el estrés oxidativo y a los antioxidantes, esto debido a su gran relevancia en relación con las enfermedades que día a día se hacen más incidentes y afectan a la población. Existe una denominada "paradoja del oxígeno", esta se define así por el hecho de que los organismos aeróbicos requieren oxígeno para sobrevivir, pero paradójicamente el oxígeno también es inherentemente tóxico para estos organismos debido a su asociación con la generación de radicales libres y el estrés oxidativo. Muchos de estos radicales libres son productos comunes de la respiración mitocondrial y otras reacciones bioquímicas en las células, los cuales son procesos fisiológicos normales y esenciales para la supervivencia, pero para sobrevivir en un ambiente hostil de oxígeno, los organismos vivos deben generar antioxidantes solubles en agua y lípidos para poder neutralizar estos radicales libres altamente reactivos, y así lo hacen, solo que muchas veces se rompe este equilibrio lo cual crea un exceso de radicales libres, los cuales llegan a dañar varias biomoléculas, incluidos lípidos, proteínas, carbohidratos e incluso ácidos nucleicos (2).

En respuesta a esto los humanos no solo nos hemos preocupado por asegurarnos de que nuestro cuerpo genere los antioxidantes que normalmente debería generar, si no también nos hemos enfocado en consumir alimentos que contienen antioxidantes, dándonos cuenta así, de que existe un sinnúmero de fuentes naturales de antioxidantes, desde frutas y verduras, hasta microorganismos capaces de generar estas moléculas tan deseadas hoy en día. Uno de los antioxidantes más potentes conocidos actualmente es la astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4,4'-diona), este antioxidante es una molécula derivada del β caroteno, y es sintetizada por diferentes especies animales y vegetales; pero la fuente natural con mayor capacidad para sintetizar este carotenoide secundario es una microalga llamada *Haematococcus pluvialis*, la cual en condiciones de estrés es capaz de enquistarse y sintetizar astaxantina de novo.

Pero el interés reciente por los antioxidantes no se genera a partir de la importancia de la astaxantina, sino más bien, por los antioxidantes que se encuentran en la

naturaleza en general. Lo cual hace décadas despertó el interés en los investigadores en desarrollar técnicas que “midan” la capacidad antioxidante de un extracto o una sustancia. Es así como se tienen diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante, pero en 1993 Guohua Cao y colaboradores, logran desarrollar el ensayo de la capacidad de absorbancia del radical oxígeno, más conocido como ORAC, el cual en los siguientes años sufrió ciertas modificaciones las cuales lo convirtieron en un ensayo mucho más sensible y reproducible, lo que le daba ventaja por sobre otras técnicas.

Sin embargo, el ensayo ORAC, tiene una limitación y es que al tratarse de un ensayo el cual tiene un entorno acuoso (incluso por eso se utiliza Trolox, que es un análogo hidrosoluble de la vitamina E), no se puede evaluar adecuadamente la capacidad antioxidante de antioxidantes lipofílicos, como es el caso de la astaxantina. Es por eso que, en el 2002 Dejian Huang y colaboradores, hacen la modificación al ensayo ORAC, creando así el ensayo ORAC-LIPO; en el cual se respeta el fundamento original de ORAC-FL (modificación del ORAC original desarrollado por Cao et al., en el cual se utiliza fluoresceína). En este ensayo modificado por Huang se incluye una molécula llamada β -ciclodextrina metilada, la cual cumplirá funciones de potenciador de solubilidad, lo que hará que la molécula antioxidante no soluble en agua sea hidrosoluble, dándole así al ensayo ORAC la capacidad de evaluar también a antioxidantes liposolubles.

La presente tesis se divide en cinco partes: una primera parte que comprende el planteamiento de la investigación, en la que se plasman los objetivos, la hipótesis, así como las variables e indicadores. Un primer capítulo que contiene el marco teórico en el cual se consideran las bases teóricas del estrés oxidativo, antioxidantes y ORAC, y donde también se describe a la microalga *Haematococcus pluvialis*, su morfología, condiciones de crecimiento y biosíntesis de astaxantina. El segundo capítulo que incluye los materiales empleados, los métodos ejecutados en la investigación, el diseño del fotobiorreactor utilizado, así como la metodología de trabajo con la cepa de *H. pluvialis*. El tercer capítulo muestra los resultados obtenidos, los análisis estadísticos correspondientes y una discusión de estos, considerando resultados y conclusiones de investigaciones previas. Finalmente se presenta un cuarto y quinto capítulo con las conclusiones y

recomendaciones a las que se llegó tras el análisis de los resultados obtenidos, con el fin de contribuir e incentivar la investigación en el campo de antioxidantes y su medición con el ensayo ORAC.



Objetivos.

Evaluar el efecto antioxidante del extracto de la microalga *Haematococcus pluvialis*, usando el ensayo ORAC_{FL} y su modificatoria para antioxidantes lipofílicos ORAC-L.

Objetivos secundarios.

1. Diseñar y construir fotobiorreactores para el cultivo de microalgas en el laboratorio.
2. Purificar y cultivar la microalga *Haematococcus pluvialis* en condiciones de estrés.
3. Realizar pruebas preliminares del ensayo ORAC para desarrollar el ensayo ORAC-H y ORAC-L.
4. Evaluar la capacidad antioxidante utilizando los ensayos: ORAC-H y ORAC-L, de los extractos obtenidos a partir de microalgas.

Hipótesis.

Dado que la microalga *Haematococcus pluvialis*, tiene en su composición potentes antioxidantes, es probable que la capacidad antioxidante de estos pueda ser evaluada por el ensayo ORAC_{FL} adaptado a un termociclador para PCR en tiempo real.



Capítulo 1.

Marco Teórico.

1.1 Estrés Oxidativo.

El estrés oxidativo es un concepto comúnmente usado y estudiado hoy en día. Se le relaciona significativamente con enfermedades de alta incidencia (Figura 1) como la diabetes, hipertensión, aterosclerosis, insuficiencia renal aguda, enfermedad de Alzheimer y Parkinson, entre otras. El metabolismo celular del oxígeno genera especies reactivas de oxígeno o también conocidas como ROS (por sus siglas en inglés) potencialmente tóxicas. En condiciones normales, la velocidad y la magnitud de la formación de oxidantes se equilibran con la tasa de eliminación de oxidantes. Sin embargo, un desequilibrio entre pro-oxidantes y antioxidantes produce el denominado estrés oxidativo. El aumento de los niveles de las ROS en la célula tiene un impacto significativo ya sea porque conduce a la función defectuosa celular, el envejecimiento o hacia alguna enfermedad (3).

Las reacciones de óxido-reducción en los sistemas biológicos representan la base de varios mecanismos bioquímicos de los cambios metabólicos (4). En los sistemas biológicos, en lugar de utilizar los términos reducción y agente oxidante, es más frecuente utilizar las denominaciones de antioxidante y pro-oxidante, respectivamente (5). Un agente reductor, o antioxidante, es una sustancia que dona electrones, mientras que un oxidante, o agente pro-oxidante, es una sustancia que acepta electrones (3).

El estrés oxidativo está relacionado a muchos procesos previos que dan como resultado enfermedades de alta incidencia, estos desperfectos se producen cuando existe un desequilibrio entre la producción ROS y la capacidad del sistema biológico para equilibrar estos compuestos o reparar el daño resultante (5).

Las especies reactivas de oxígeno son una familia de especies altamente reactivas que pueden ser beneficiosas, ya que son utilizadas por el sistema inmune como una forma de atacar y eliminar patógenos que pudieran entrar a nuestro cuerpo, lo que quiere decir que es de vital importancia contar con tal mecanismo en nuestro

cuerpo. El problema radica cuando estas ROS se encuentran en exceso ya que pueden causar daño celular directamente o funcionando como productos intermediarios en diversas vías de señalización, originando así daños que luego potencialmente se convierten en enfermedades (6).

1.1.1 Especies reactivas de oxígeno como mediadores del daño celular.

Como se mencionó anteriormente, las ROS tienen funciones fisiológicas que resultan ser vitales para las células como, por ejemplo; las vías de producción de prostaglandinas y la defensa del organismo a nivel inmunológico (7).

Sin embargo, las ROS tienen una participación compartida en rutas comunes que causan daño celular, directamente o como intermediarios en diversas vías de señalización, incluyendo daño al ADN, oxidación de proteínas, entre otros (6).

1.1.1.1 Daño en el ADN

Las modificaciones oxidativas del ADN son frecuentes en los mamíferos y se han señalado como importantes factores que contribuyen en mecanismos que dan inicio al cáncer, la diabetes y el envejecimiento natural. Los daños en el ADN inducidos por las ROS se consideran las modificaciones celulares más graves, ya que se debe tener en cuenta que el ADN no se sintetiza de nuevo (ósea no se genera uno nuevo), sino que se copia, perpetuando así las modificaciones ocasionadas y, por lo tanto, induciendo mutaciones e inestabilidad genética (6).

1.1.2 Especies reactivas de oxígeno como factores para el desarrollo de enfermedades.

En condiciones normales, los sistemas enzimáticos y no enzimáticos preservan el equilibrio oxidante / antioxidante. Sin embargo, estos sistemas suelen responder defectuosamente cuando existe estrés oxidativo que es un trastorno metabólico debido a un desequilibrio causado por una generación excesiva de ROS o por una capacidad disminuida del sistema antioxidante. De cierta forma, podría considerarse que las enfermedades son el resultado de fallas en el funcionamiento celular que pueden conducir o no a alteraciones sistémicas

como resultado de una reacción en cadena. La alteración de la función celular puede ser causada por varios factores, por lo general, más de uno que actúa al mismo tiempo, aportando en la misma vía y atenuando así, el daño (8). Con las recientes investigaciones se cree que las especies reactivas de oxígeno contribuyen a la patogenia de una serie de trastornos aparentemente no relacionados, que incluyen diabetes, cáncer y envejecimiento, insuficiencia cardíaca, hipertensión, preclamsia y aterosclerosis, entre otros (3). Todas estas patologías fueron causas importantes de morbilidad y mortalidad en el siglo XX y se han estudiado ampliamente en los últimos años. El estrés oxidativo no ha sido ajeno a esto, ya que ha aportado de diferentes formas, a que se desencadenen estas enfermedades; ya sea desde el simple hecho de cómo nos alimentamos hasta incluso los oxidantes externos a los que estamos expuestos, como por ejemplo la alta radiación UV en Arequipa, o a los niveles altos de contaminación a los que estamos expuestos en diferentes ciudades (9).

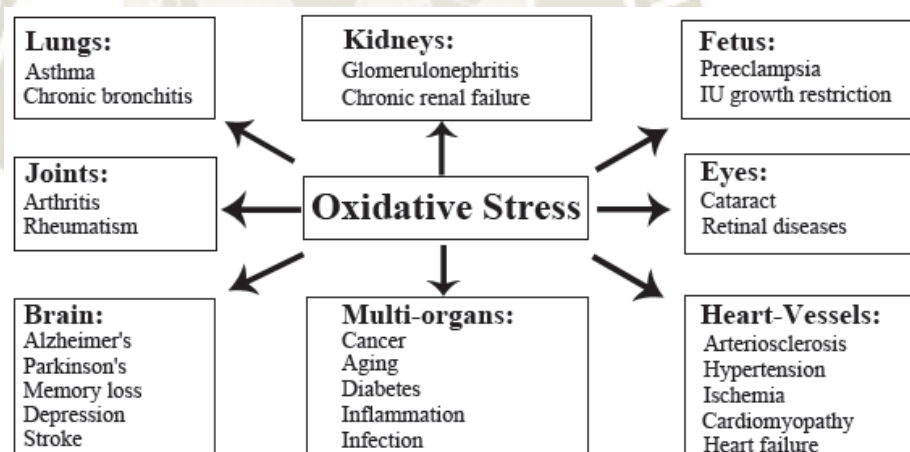


Figura 1: Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo (10).

Para plasmar esto de una mejor manera, en la Figura 1, se describe brevemente la relación de ciertas enfermedades y del envejecimiento, con el estrés oxidativo.

1.1.2.1 Enfermedades cardiovasculares.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en el mundo. Estimaciones recientes consideran que su prevalencia seguirá aumentando en las próximas décadas, cifras indican una gran prevalencia estimada para el año 2030 (11), debido a un aumento en la población de personas mayores y un estilo de vida no saludable. Las especies reactivas de oxígeno tienen un rol clave en la homeostasis de la pared vascular y hay pruebas contundentes (como en el caso de la hipertensión) que apuntan a las ROS como factores importantes para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (3).

1.1.2.1.1 Hipertensión.

La hipertensión es probablemente la enfermedad crónica más prevalente en el mundo. Es una condición silenciosa y nociva, ya que constituye una enfermedad asintomática en etapas tempranas, pero representa un factor de riesgo clave para muchas otras enfermedades. Se cree que las especies reactivas de oxígeno contribuyen a la patogénesis de la hipertensión a través de un deterioro de las células endoteliales. Con la persistencia del estrés oxidativo, la capacidad de las células endoteliales vecinas para reparar la lesión endotelial es limitada (12).

1.1.2.2 Síndrome Metabólico y Diabetes

El síndrome metabólico incluye una variedad de anomalías cardiometabólicas asociadas con un alto riesgo de desarrollar diabetes y enfermedades cardiovasculares. El estrés oxidativo crónico afecta la acción de la insulina, como se demostró en los diabéticos tipo 2. Este deterioro podría deberse a varios factores, como alteraciones de la fluidez de la membrana, disminución de la disponibilidad de NO (radical óxido nítrico) y aumento del contenido de calcio intracelular. El estrés oxidativo está estrictamente influenciado por el control glucometabólico en los diabéticos (13).

1.1.2.3 Enfermedades neurodegenerativas

1.1.2.3.1 Enfermedad de Alzheimer

Un obstáculo importante en la investigación para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (EA) es la falta de conocimiento sobre la etiología y la patogénesis de la muerte neuronal selectiva. En los últimos años, se han acumulado datos considerables que indican que el cerebro en la EA está bajo un mayor estrés oxidativo y esto puede tener un papel en la patogénesis de la degeneración neuronal y la muerte en este trastorno (6).

1.1.2.3.2 Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) es la enfermedad neurodegenerativa más común, y la mayoría de los casos de EP involucran la forma esporádica. Aunque se desconoce la etiología de la forma esporádica, se considera que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo desempeñan un papel destacado en su patogénesis (6).

1.1.2.4 Preeclampsia

La preeclampsia es un trastorno humano específico del embarazo que afecta directamente a la madre gestante, la disfunción vascular y al feto a través de la restricción del crecimiento intrauterino. La incidencia de preeclampsia es de alrededor del 5% de todos los embarazos, y constituye la principal causa de mortalidad materna en los países desarrollados. El evento clave que conduce a las manifestaciones de la preeclampsia es la disfunción de las células endoteliales, que probablemente es causada, entre otros factores, por un aumento en la concentración de ROS (14).

1.1.2.5 Glaucoma

Cada vez más pruebas indican que las ROS desempeñan un papel clave en la patogénesis del glaucoma primario, la principal causa de ceguera irreversible en todo el mundo. El daño oxidativo del ADN aumenta

significativamente en el epitelio ocular que regula la salida del humor acuoso, causando así daños irreparables en la vista (15).

1.1.2.6 Envejecimiento.

El envejecimiento suele definirse como una disminución paulatina en la capacidad del organismo para resistir el estrés oxidativo, así como a las enfermedades. Aunque actualmente existen muchas teorías para explicar este fenómeno, todavía no se entiende bien por qué los organismos envejecen y la razón por la cual el proceso de envejecimiento puede variar de individuo a individuo. La hipótesis del estrés oxidativo como causante del envejecimiento es una de las teorías que más fuerza a tomado en los últimos años. Esta teoría propone que las ROS producidas durante la respiración celular dañan los lípidos celulares, proteínas e incluso el ADN, acelerando así el proceso de envejecimiento, y aumentan el riesgo de enfermedad (16). Por otro lado, también se especula que el cáncer estaría siendo iniciado por daños causados por el estrés oxidativo, teniendo una relación estrecha con el envejecimiento.

1.1.2.7 Daño renal

Evidencia experimental respalda la opinión de que las ROS podrían desempeñar un papel importante en los procesos fisiopatológicos de las enfermedades renales, incluida la insuficiencia renal crónica, la insuficiencia renal aguda, la fibrosis renal, la formación de cálculos renales, entre otros (17).

La abundancia de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) hace que el riñón sea un órgano particularmente vulnerable al ataque de las ROS. La relación de las ROS en el mecanismo del daño renal se apoya en evidencia experimental como por ejemplo la detección de productos de daño oxidativo en tejido renal u orina, además se cree que el estrés oxidativo aumenta la expresión de moléculas de adhesión, compuestos quimiotácticos y citoquinas inflamatorias (3).

1.2 Antioxidantes.

Como se vio anteriormente, los antioxidantes son los encargados de mantener el equilibrio contra los oxidantes, actuando como reductores. Por su lado el cuerpo humano es capaz de actuar frente al desequilibrio y defenderse del estrés oxidativo. La defensa antioxidante del cuerpo consiste en compuestos exógenos y endógenos, que se pueden clasificar en tres grandes categorías: enzimas antioxidantes, antioxidantes rompedores de cadenas y proteínas de unión a metales. Las principales enzimas antioxidantes son: la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y peroxidasas, que son de origen endógeno, lo que quiere decir que nuestro cuerpo se encarga de sintetizarlas. Los antioxidantes que interfieren con las reacciones en cadena iniciadas por los radicales libres se conocen como antioxidantes rompedores de cadena. Estos antioxidantes son pequeñas moléculas que pueden ser solubles en agua o insolubles en esta (solubles en lípidos). Algunos de estos antioxidantes se derivan de la dieta, como carotenoides, flavonoides y vitaminas antioxidantes. Las proteínas endógenas como la ferritina, la transferrina y la ceruloplasmina también son proteínas antioxidantes importantes porque son capaces de unir iones metálicos como el cobre y el hierro, de modo que no se generan radicales libres a través de la reacción de Fenton (reacción donde una pequeña cantidad de hierro forma complejos con una variedad de moléculas pequeñas las cuales pueden reaccionar con el peróxido de hidrógeno, produciendo el radical hidroxilo) (18). Por lo general, las enzimas antioxidantes proporcionan la mayor defensa antioxidante, pero aun así todos los antioxidantes son importantes para la neutralización adecuada del estrés oxidativo (2).

1.2.1 Antioxidantes rompedores de cadena.

Si bien es cierto el cuerpo es capaz de defenderse frente al estrés oxidativo mediante enzimas antioxidantes como por ejemplo la SOD (ya antes mencionada), existe también un gran grupo de antioxidantes que “colaboran” con el equilibrio oxidante-antioxidante, a estos se les denomina: antioxidantes “chain-breaking”, o antioxidantes rompedores cadena (2).

Los antioxidantes rompedores de cadena pueden ser de origen endógeno o exógeno. Un ejemplo común de una reacción en cadena iniciada por radicales libres es la peroxidación de lípidos. Los antioxidantes que rompen cadenas actúan donando un electrón o recibiendo un electrón de una especie de radicales libres, convirtiéndolo así en una especie estable. Los antioxidantes que rompen la cadena se pueden clasificar en dos grandes categorías: solubles en agua y solubles en lípidos. El antioxidante soluble en agua más importante es la vitamina C también conocido como ácido ascórbico. La vitamina C es capaz de estabilizar superóxido, hidroxilo y radicales peroxilo acuosos, así como otros oxidantes, como el peróxido de hidrógeno y el ácido hipocloroso (2). En este proceso, la vitamina C se oxida en ácido dehidroascórbico, que eventualmente se descompone en ácido oxálico. El ácido úrico presente en la sangre humana actúa como un antioxidante por su lado, el ácido úrico también forma complejos con el hierro, evitando así la dañina reacción de Fenton. La bilirrubina, el producto final del catabolismo del hemo, es también un buen antioxidante que protege a las células de los niveles tóxicos de peróxido de hidrógeno, la bilirrubina también puede neutralizar los radicales peroxi (19).

El antioxidante soluble en grasa más importante es la vitamina E, que existe en ocho estados diferentes (4 tocoferoles y 4 tocotrienoles). Sin embargo, el α -tocoferol, la forma común de esta vitamina, es muy eficiente para romper la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Los carotenoides también son importantes antioxidantes solubles en lípidos, y la forma más común es el β -caroteno. Estos antioxidantes también pueden neutralizar los radicales peroxi, así como el oxígeno singlete. Además, el β -caroteno es un precursor de la vitamina A, que también tiene actividad antioxidante. La forma reducida de la coenzima Q10 (también conocida como ubiquinol-10) también es un antioxidante soluble en lípidos que es capaz de atrapar el radical peroxilipídico (20).

1.2.2 Antioxidantes en la naturaleza.

Los antioxidantes distribuidos en la naturaleza son varios, se pueden encontrar en plantas, crustáceos, e incluso en microalgas. La mayoría de ellos sintetizan

moléculas antioxidantes para defenderse del entorno oxidante o bien de condiciones desfavorables para sí mismos. Se pueden encontrar antioxidantes en frutas como la uva, manzana, o en los denominados “berries” como los arándanos, ciruelas, fresas, etc. En crustáceos como los cangrejos o los camarones, o en peces como la trucha que en este caso mantiene una dieta especial rica en colorantes antioxidantes para tener el color rojo característico de truchas. Muy buenos antioxidantes también suelen ser las bebidas como el té, café, e incluso las bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza. Finalmente existe un grupo de microalgas capaces de sintetizar antioxidantes a modo de protección frente a un estrés oxidativo, estas microalgas como la *Chlorella vulgaris*, *Dunaleilla salina* o *Haematococcus pluvialis*, han tomado una gran importancia biotecnológica en los últimos años ya que estas tienen el potencial de producir antioxidantes en concentraciones considerables en condiciones relativamente sencillas (21)(22)(1).

Los flavonoides también son antioxidantes que se encuentran en plantas y alimentos como frutas y verduras. Por ello consumir té o café puede proporcionar suficientes flavonoides para una adecuada defensa antioxidante del cuerpo humano (3).

1.3 ORAC.

Para medir la capacidad antioxidante de un compuesto o un extracto se usan varios métodos. En general, los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) o de transferencia electrónica simple (SET) se usan ampliamente para medir la capacidad antioxidante total de un compuesto o mezcla, y algunos de estos métodos también se suelen utilizar para medir la capacidad antioxidante total de suero o plasma humano. En los métodos basados en HAT, se mide la capacidad de los antioxidantes para eliminar los radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno. Estas reacciones son independientes del pH y del solvente, y generalmente son reacciones rápidas, ya que se completan en segundos. En este caso la reactividad relativa está determinada por la energía de disociación del enlace del grupo donador de hidrógeno del antioxidante (2). La mayoría de los ensayos de reacción HAT

aplican un esquema de reacción competitivo en el que el antioxidante y el sustrato usados en el ensayo compiten por captar los radicales peroxilo generados térmicamente a través de la descomposición de un compuesto azo. Si el antioxidante logra atrapar los radicales peroxilo, la señal no se verá afectada ósea, no disminuirá. Por lo tanto, la magnitud de la reducción de la señal (principalmente fluorescencia) se correlaciona inversamente con la capacidad antioxidante de la muestra (mientras menos reducción de la señal, mayor capacidad antioxidante). En los métodos basados en SET, la capacidad de un antioxidante se mide por su capacidad de transferir un electrón para reducir cualquier compuesto, ya sean radicales libres, carbonilos o iones metálicos. La reactividad relativa de un antioxidante en los ensayos basados en SET depende del potencial de ionización del grupo funcional reactivo en la molécula. Por lo tanto, estas reacciones si dependen del pH y, en general, el potencial de ionización disminuye al aumentar el pH, lo que indica una mayor capacidad de donación de electrones debido a la deprotonación (18). En los ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones, cuando se reduce el oxidante, cambia de color y el grado de cambio de color se correlaciona con la capacidad antioxidante (23).

Uno de los ensayos que ha cobrado más importancia en los últimos años es el del valor de la **capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (ORAC)**, o "puntuación ORAC", que es un método para medir la capacidad antioxidante de diferentes alimentos y suplementos, desarrollado inicialmente por científicos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos y luego más tarde, los científicos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) perfeccionaron el ensayo. El ensayo ORAC es una técnica del tipo HAT (trasferencia de átomos de hidrógeno) (2).

El ensayo ORAC fue desarrollado originalmente por Cao et al. (24). Al pasar de los años, varios científicos modificaron este ensayo, pero el principio es básicamente es el mismo. El ensayo ORAC resulta ser muy útil para determinar la efectividad de los antioxidantes rompedores de cadenas que son los principales antioxidantes presentes en los alimentos. En el ensayo ORAC, los radicales peroxilo generados por la descomposición térmica del 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH) disminuyen la fluorescencia de un

compuesto llamado fluoresceína. La capacidad antioxidante de una muestra se mide por la capacidad que tiene la muestra para impedir la pérdida de la señal de fluorescencia, neutralizando los radicales peroxilo. La disminución de la señal de fluorescencia debe ser mínima si la muestra es rica en compuestos antioxidantes y, por lo contrario, la señal puede decaer rápidamente si el componente antioxidante de la muestra probada no es un buen antioxidante. La capacidad antioxidante se expresa generalmente como equivalentes Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Trolox es un análogo de la vitamina E, pero soluble en agua, que es un excelente antioxidante. Debido a la dificultad de medir la capacidad antioxidante de componentes individuales de frutas, verduras o suplementos, el equivalente Trolox se usa para especificar la capacidad antioxidante total de tales mezclas complejas de antioxidantes presentes en los alimentos. Por lo general, el equivalente de Trolox se expresa como micromoles de Trolox / 100 g de muestra o bien en micromoles de Trolox / 100 mL de muestra. En artículos de investigación publicados, los valores ORAC se utilizan para describir la capacidad antioxidante de diversos alimentos, bebidas y suplementos. Algunos investigadores a veces utilizan una unidad similar (milimoles de Trolox / 100 g) para expresar los valores de ORAC (2).

1.4 ORAC-LIPO.

Los antioxidantes se pueden clasificar físicamente por su solubilidad en dos grupos (25). Un primer grupo que lo conforman los antioxidantes hidrófilos, como la vitamina C y la mayoría de los compuestos polifenólicos, y un segundo grupo que son los antioxidantes lipófilos, que incluyen principalmente a la vitamina E y carotenoides. Similar a los antioxidantes hidrofílicos, los antioxidantes lipofílicos juegan un papel importante en un amplio espectro de procesos bioquímicos y fisiológicos. A diferencia de los antioxidantes hidrofílicos, que no se acumulan en el cuerpo y se excretan en la orina, los antioxidantes lipófilos penetran más fácilmente en la membrana celular de las lipoproteínas y, por lo tanto, alcanzan un mayor nivel de biodisponibilidad, lo que podría verse traducido como una mejor actividad y efecto con respecto a los antioxidantes hidrofílicos (26). Existen varios métodos disponibles para medir la actividad antioxidante, como el ensayo de la

capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (ORAC), mencionado anteriormente; todos estos métodos (incluyendo el ORAC) se llevan a cabo en un sistema acuoso, como tales, ninguno de estos es adecuado para antioxidantes lipófilos. Huang et. al. superan este inconveniente introduciendo una molécula llamada β -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RMCD). Esta molécula cumple funciones de receptor molecular para mejorar la solubilidad de antioxidantes lipofílicos en solución acuosa. En general, las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos (R-1,4) unidos de R-D-gluco-piranosas que contienen una cavidad central relativamente hidrófoba (similar a la grasa) y una superficie externa hidrófila (acuosa). Esta propiedad de las CD las hace conocidas como vehículo para mejorar la solubilidad de compuestos liposolubles en un entorno acuoso en industrias farmacéuticas y alimentarias (27) (28) .

1.5 Termociclador

Un termociclador es un equipo utilizado en biología molecular en el cual se puede programar los ciclos de temperaturas requeridos para la amplificación de diversas hebras de ADN en la técnica de la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa). Por lo general el termociclador se conforma por una placa a la cual llega temperatura homogénea distribuida por una resistencia eléctrica, durante tiempos previamente programados, normalmente los rangos de temperatura son de 4 °C a 96 °C donde ocurre la desnaturalización, hibridación y extensión de la molécula de ADN con la que se esté trabajando (29).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta y ha ayudado en bastantes investigaciones en un inicio, pero presenta algunos inconvenientes, uno de ellos es que esta técnica no es cuantitativa. Para resolver este inconveniente se generó unas variaciones sobre el esquema inicial de la PCR, dando lugar a lo que se conoce hoy en día como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. La diferencia en esta PCR es que existe la posibilidad de cuantificar y detectar en tiempo real la amplificación del gen con el que se trabaja. Para que pueda suceder esto una de las técnicas más utilizadas se basa en la utilización de otro fragmento de ADN (sonda) complementario a una parte intermedia del ADN que se pretende amplificar. Esta sonda lleva consigo una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de esta forma sólo cuando la sonda es movida de su

sitio por acción de la ADN-polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción de la molécula inhibidora (quencher) y emite fluorescencia al ser irradiada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será directamente proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando (29).

Todo esto desde luego es medido por un termociclador que tiene la función no solo de mantener la temperatura y los tiempos programados, sino también de hacer la medición de la fluorescencia que emite el ensayo, arrojando resultados gráficos de fluorescencia versus tiempo.

1.6 Lector de placas: Varioskan LUX

De lo recopilado del manual del equipo: Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX es un lector modular de microplacas multitecnología. Varioskan LUX está controlado por el software Thermo Scientific™ SkanIt™ para lectores de microplacas. En este se puede realizar los siguientes trabajos (30):

- Absorbancia
- Intensidad de fluorescencia (FI)

Dependiendo del modelo del instrumento, las siguientes tecnologías de detección opcionales (módulo LAT)

- Luminiscencia
- AlphaScreen
- Fluorescencia de resolución temporal (TRF)

1.7 *Haematococcus pluvialis*.

Existen más de 7000 especies de "microalgas verdes" las cuales crecen en una amplia variedad de hábitats. *Haematococcus pluvialis* es una microalga unicelular de agua dulce distribuida en muchos hábitats en todo el mundo. Actualmente es considerada como la mejor fuente natural de astaxantina y el principal microorganismo productor de este producto comercial (1). La astaxantina (3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4,4'-diona) es un carotenoide secundario de color rojo brillante de la misma familia que el licopeno, la luteína y el β -caroteno, sintetizado de novo por algunas microalgas, plantas, levaduras, bacterias y además presentes en muchos mariscos y pescados, incluidos el salmón, la trucha, el besugo, el

camarón, la langosta y los huevos de pescado (1). La astaxantina contiene dos centros quirales y puede existir en tres estereoisómeros diferentes, (3S, 3'S); (3R, 3'S) y (3R, 3'R). Durante la síntesis química de este compuesto se obtiene una relación 1:2:1 de estos isómeros, sin embargo la microalga *H. pluvialis* biosintetiza predominantemente el estereoisómero 3S, 3'S, que es el más valioso (31) (32). La astaxantina tiene una amplia gama de aplicaciones en las industrias alimentarias, cosméticas, de acuicultura, nutracéuticas y farmacéuticas debido a su capacidad de eliminación de radicales libres. En términos de capacidad antioxidante, la astaxantina es 65 veces más potente que la vitamina C, 54 veces más potente que el β -caroteno, 10 veces más potente que, la cantaxantina, la zeaxantina y la luteína; y 100 veces más efectivo que el α -tocoferol (33) (34). Actualmente, más del 95% de la astaxantina disponible en el mercado se produce sintéticamente; mientras que la astaxantina natural derivada de *H. pluvialis* corresponde a <1% de la cantidad comercializada. La astaxantina sintética, es sintetizada a partir de la sal de fosfonio de asta-C15 y el dialdehído C10 en una reacción de Wittig, esta tiene una capacidad antioxidante 20 veces menor que su homólogo natural y hasta la fecha no ha sido aprobado para consumo humano (35). Además, existen preocupaciones sobre la seguridad del uso de astaxantina sintética para el consumo humano directo debido a la estereoquímica diferente y al potencial de arrastre de los intermediarios de síntesis. Estas preocupaciones hacen que la astaxantina natural de *H. pluvialis* sea la alternativa para los mercados de alta gama (36). Además, la microalga *H. pluvialis* ya ha sido aprobada como aditivo colorante en alimentos para salmones y como suplemento dietético para consumo humano en los EE. UU., Japón y varios países europeos (37).

La creciente demanda de astaxantina natural y su alto precio despierta el interés en sistemas eficientes para producir astaxantina a partir de *H. pluvialis*. La acumulación de astaxantina se ve afectada por factores ambientales como la luz (38) (39), temperatura (40), pH (41), concentración de sal (42), y estrés nutricional (43) (44), así como diversas hormonas vegetales y sus derivados (45). Hay varios métodos de extracción de astaxantina que utilizan solventes, ácidos, aceites comestibles, enzimas, líquidos presurizados (46) (47), dióxido de carbono supercrítico (SC-CO₂) (48). Ya que la astaxantina tiene un gran potencial en el

mercado global (280 toneladas métricas, \$ 447 millones en 2014 para astaxantina sintética y natural) y un alto valor de mercado (\$ 2500-7000 / kg) (34)(35), la investigación de *H. pluvialis* en cuanto a su biología, fisiología, técnicas de cultivo eficientes, bioprocesamiento y formación de productos son altamente deseables para un mayor desarrollo de este sector, y desde luego la biotecnología no es ajena a este campo de investigación y desarrollo.

1.7.1 Taxonomía y ocurrencia.

La microalga verde biflagelada de agua dulce *H. pluvialis* pertenece a la clase *Chlorophyceae*, orden *Volvocales* y familia *Haematococcaceae*. También se lo conoce como *Haematococcus lacustris* o *Sphaerella lacustris*. El *Haematococcus* fue descrito por primera vez por J. Von Flotow en 1844 y más tarde en 1899 Tracy Elliot Hazen presentó ampliamente su biología y ciclo de vida (1). *H. pluvialis* es común en pequeños cuerpos transitorios de agua dulce y ampliamente distribuidos en muchos hábitats en todo el mundo. Se encuentra normalmente en espacios de agua temporales como piscinas de lluvia efímeras, piscinas artificiales, estanques naturales y artificiales e incluso en bebederos para pájaros. Esta microalga se puede encontrar generalmente en regiones templadas de todo el mundo además de lugares con diversas condiciones ambientales y climáticas.

1.7.2 Morfología celular y ciclo de vida.

La estructura celular de *H. pluvialis* es similar a la mayoría de los otros miembros de las algas verdes unicelulares volvocales. El ciclo de vida de *H. pluvialis* consiste en cuatro tipos de morfologías celulares distinguibles: macrozooides (zoosporas), microzooides, palmelas y hematocistos (aplanosporas) (1). Los macrozooides (zoosporas), los microzooides y las etapas de la palmella generalmente se denominan "fase vegetativa verde" (Figura 2). Los hematocistos (aplanosporas) se conocen como "fase enquistada acumulada de astaxantina o roja no móvil" del ciclo de vida de *H. pluvialis* (Figura 3 C, D). Los Macrozooides (zoosporas) son esféricas, elipsoidales o células en forma de pera con dos flagelos de igual longitud que emergen del extremo anterior, y un cloroplasto en forma de copa. (Figura 3A) (49). Estas

células vegetativas flageladas de crecimiento rápido predominan en condiciones de cultivo favorables en la etapa de crecimiento vegetativo temprano (Figura 3 A). Los macrozoides pueden dividirse en 2-32 células hijas por mitosis (50) (Figura 2).

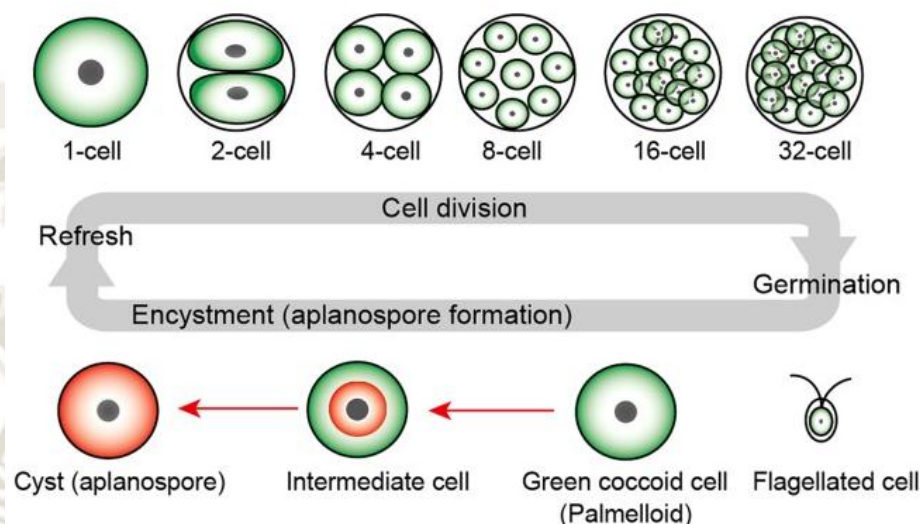


Figura 2: Ciclo de vida del *Haematococcus pluvialis* (1).

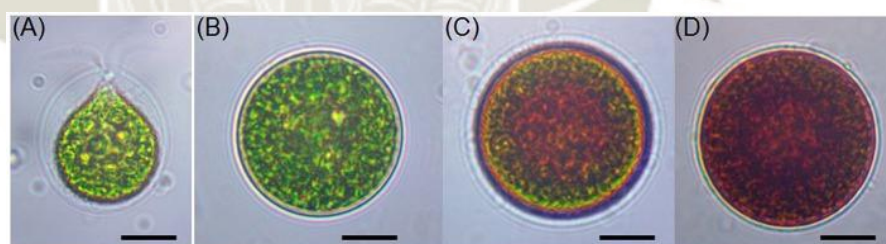


Figura 3: Estadios en los ciclos de vida del *Haematococcus pluvialis* (1).

En condiciones ambientales desfavorables, los macrozoides comienzan a perder flagelos y a expandir el tamaño de sus células. Forman una estructura multicapa amorfa en las regiones internas de la matriz extracelular o la pared celular primaria a medida que se desarrollan en "palmella" no móviles y se convierten en células vegetativas en reposo (49) (Figura 3 B). Con el continuo estrés ambiental (es decir, privación de nutrientes, alta irradiancia lumínica, alta salinidad) y el cese de la división celular, la "palmella" se transforma en

"aplanosporas" asexuales (Figuras 3 C, D). Estas células se vuelven resistentes a las condiciones ambientales extremas predominantes (51) (52). Las aplanosporas maduras; acumulan grandes cantidades de carotenoides secundarios, particularmente astaxantina, en las gotas de lípidos depositadas en el citoplasma, lo que da como resultado un característico color rojo brillante de estas células (49). Una vez que las condiciones ambientales o de cultivo vuelven a ser óptimas, las aplanosporas rojas germinan para formar zoosporas flageladas para iniciar un nuevo ciclo de crecimiento vegetativo (Figura 3A). En algunos casos, la gametogénesis puede ocurrir en aplanosporas, este proceso requiere una exposición a condiciones adversas extremas (congelación, desecación o inanición de nutrientes) seguido por el retorno a condiciones de cultivo favorables.

1.7.3 *Haematococcus pluvialis* como fuente principal de astaxantina.

H. pluvialis puede acumular hasta 5% (peso seco) de astaxantina y se considera como la mejor fuente natural de este pigmento carotenóide de alto valor (50). Los suplementos dietéticos que contienen astaxantina de *Haematococcus* han demostrado ser seguros para los humanos y ampliamente utilizados por más de 15 años como un suplemento nutracéutico sin efectos secundarios adversos de su suplementación (31). La astaxantina natural de *H. pluvialis* está disponible en el mercado como un suplemento dietético en dosis de 3,8 a 7,6 mg por día debido a los posibles beneficios para la salud. Como la sociedad hoy en día busca soluciones "verdes", la astaxantina natural de *H. pluvialis* se coloca como la opción más favorable que su contraparte sintética debido a su estructura, función, aplicación y seguridad (34).

1.7.4 Biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis*.

La biosíntesis de astaxantina en *H. pluvialis* (mostrada en la Figura 4) es un proceso complejo que está altamente regulado en condiciones de estrés y que coincide con la acumulación de triacilglicerol (TAG). Desde la perspectiva bioquímica, la astaxantina se sintetiza a través de la ruta de los carotenoides a partir de gliceraldehído-3-fosfato y el piruvato. Ambos compuestos son

productos de la fotosíntesis y/o glucólisis dependiendo de las condiciones de cultivo. Estos dos intermediarios metabólicos claves, luego entran en la ruta del no mevalonato (MEP)(DOXP) para generar el intermediario clave: pirofosfato de isopentenilo (IPP) para la síntesis de todos los carotenoides, incluida la astaxantina.

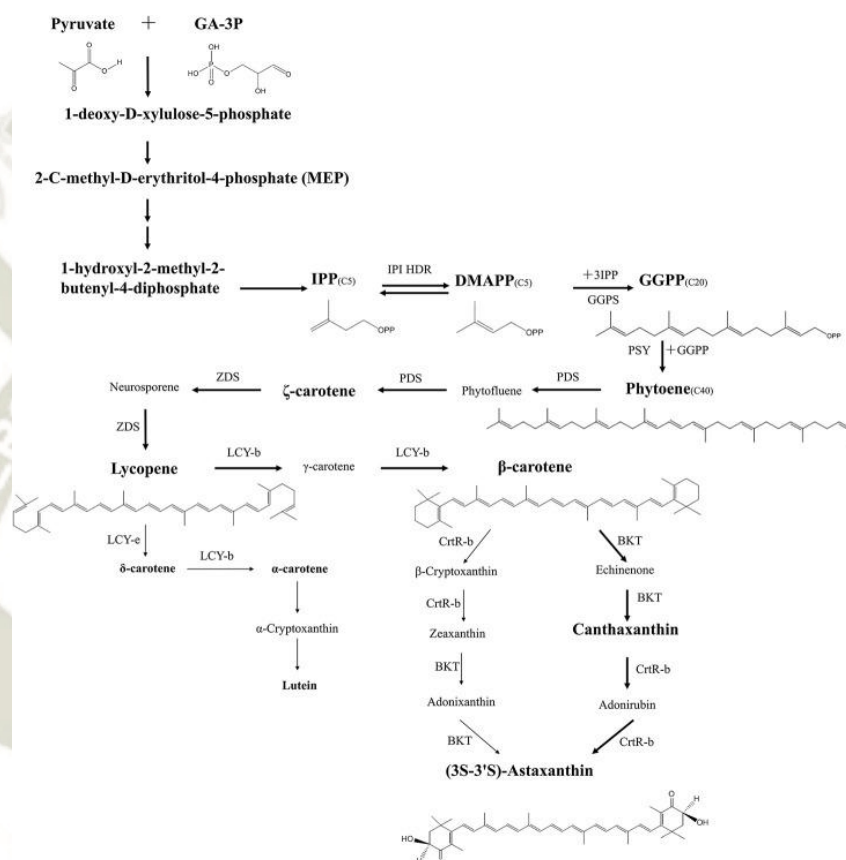


Figura 4: Biosíntesis de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* (1).

La astaxantina pertenece a los carotenoides, un tetraterpeno C40, sintetizado a partir de unidades de isopreno. El isopentenil pirofosfato (IPP) es un intermediario clave de la síntesis de carotenoides (53). El proceso de biosíntesis de astaxantina se presenta en la Figura 4. El IPP derivado de la vía DOXP es un componente básico inicial de la síntesis de astaxantina. En la etapa posterior, el IPP sufre una isomerización a dimetilalil difosfato (DMAPP). Se han hecho sugerencias de que la enzima, 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR) es la responsable de catalizar la interconversión entre IPP y DMAPP (53). El alargamiento de la cadena isoprenoide se inicia con una molécula de DMAPP y una adición lineal posterior de tres moléculas de IPP catalizadas por

una enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS) (54). El paso final de este proceso es la formación de un compuesto C₂₀, geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), un precursor compartido con otros isoprenoides. El primer paso comprometido de la síntesis de carotenoides es catalizado por la fitoeno sintasa (PSY) y da como resultado una condensación cabeza a cola de dos moléculas de GGPP para formar un compuesto C₄₀-fitoeno que sirve como precursor de astaxantina y otros carotenoides (54). La formación posterior de compuesto licopeno altamente insaturado procede a través de cuatro pasos de desaturación catalizados por dos fitoeno desaturasas (PDS) y una ζ -caroteno desaturasa (ZDS). Las reacciones de desaturación aumentan la cantidad de enlaces dobles carbono-carbono conjugados que forman el cromóforo en los carotenoides y convierten una molécula incolora de ζ -caroteno en un licopeno de color rosa (54). Ambos términos de licopeno se someten a ciclación catalizada por licopeno ciclasas (LCY-e y LCY-b). La ciclación es un punto de ramificación de la biosíntesis de carotenoides en la mayoría de los organismos, produciendo α -caroteno (precursor de la luteína) y β -caroteno (precursor de otros carotenoides, incluida la astaxantina). En la microalga *H. pluvialis*, la gran mayoría del flujo de carbono se dirige a este último (55). Los dos últimos pasos de oxigenación catalizados por β -caroteno cetolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) son pasos limitantes de la velocidad de la síntesis de astaxantina (56) (57). Aunque en principio las reacciones catalizadas por estas dos enzimas pueden proceder en cualquier orden, una mayor especificidad de sustrato de BKT hacia β -caroteno que, a la zeaxantina, favorece la adición inicial de grupo ceto antes de que la hidroxilación enantio-selectiva de cantaxantina a astaxantina sea catalizada por CrtR-b (58). La enantioselectividad de la síntesis de astaxantina es de vital importancia para el mercado de nutraceuticos y la mayor ventaja de la astaxantina de *H. pluvialis* sobre su contraparte sintética (59) (60).

1.7.5 Condiciones de cultivo y requisitos para el crecimiento celular y la formación de astaxantina.

La optimización de los diversos parámetros de cultivo, como la composición del medio de crecimiento, la luz, el pH, la temperatura, entre otros, son

necesarios para lograr una producción alta de biomasa y astaxantina. La mayoría de estos parámetros tienen diferentes valores óptimos para la acumulación de biomasa y la producción de astaxantina. Para la inducción de la carotenogénesis, la mayor exposición a las condiciones de estrés significara la mayor acumulación de astaxantina. Los orígenes de este estrés pueden ser diversos y la acumulación exitosa de astaxantina se ha inducido tanto con altos niveles de un agente estresante como con una combinación de múltiples factores de estrés. En algunos casos, si las células están expuestas a un fuerte estrés, el crecimiento de las células cesa por completo y las células comienzan a morir en un tiempo relativamente corto (61). Varios tipos de medios de crecimiento se usan para el cultivo de *H. pluvialis*. Los medios más comúnmente utilizados son BG-11 (62), BBM, OHM (63); KM1: medio basal con fuentes de carbono orgánico en forma de acetato de sodio (42) y sus modificaciones. Una composición ideal del medio para lograr un alto índice de crecimiento y acumulación de biomasa es diferente de la composición ideal para una alta acumulación de astaxantina. Se sabe que el nitrato de sodio es la fuente de nitrógeno inorgánico más óptima (64), alternativamente, se puede usar una fuente orgánica como la urea. Cuando el cultivo está sujeto a deficiencia de nutrientes, conduce a la acumulación de astaxantina dentro de las células (38). La limitación del nitrógeno conduce a aproximadamente el doble de la tasa de producción de astaxantina que la limitación del fósforo (43). La formación de astaxantina también se puede inducir añadiendo NaCl (0.25-0.5% p / v) al medio. Además, cuando se agrega NaCl junto con acetato de sodio 2.2 mM, se puede aumentar la acumulación de astaxantina (65). La adición de Fe^{2+} 0.45 mM en forma de sulfato ferroso puede aumentar significativamente la biosíntesis de carotenoides en los quistes debido a la formación de radicales hidróxilo (66). Este efecto puede mejorarse combinando el tratamiento con Fe^{2+} con una adición de acetato de sodio y exposición a altas temperaturas (42) (67). Según la mayoría de los estudios, la temperatura adecuada para el crecimiento y la acumulación de astaxantina de *H. pluvialis* está entre 20 y 28 ° C (68). Sin embargo, la temperatura por encima de 30 ° C induce una transición del estadio vegetativo verde al estadio rojo y

se puede observar la formación de quistes rojos en 2 días. Esta transición se combina con una desaceleración significativa en el crecimiento, mientras que la acumulación de astaxantina es 2-3 veces mayor que a 20 ° C. El aumento de temperatura probablemente afecte la síntesis de astaxantina a través de la estimulación de la formación de radicales de oxígeno y su mayor reactividad (67). El pH también puede afectar significativamente el crecimiento celular y la síntesis de clorofila y carotenoides en *H. pluvialis*. En términos de producción de biomasa y astaxantina, el pH óptimo está dentro del rango de 7.00-7.85 (64). La irradiación típica para el cultivo de *H. pluvialis* oscila entre 40 y 50 μmol de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (39). La irradiación óptima para lograr altas tasas de crecimiento tiende a ser mayor, es decir, 70 (69), 80 (38), o incluso hasta 177 μmol . fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (70). Durante el cultivo en etapa vegetativa de *H. pluvialis*, los ciclos regulares de alternancia de luz y oscuridad 12:12 o 16:8 h se usan a menudo (38), pero los cultivos de mayor densidad son logrados con iluminación continua (70). La mejor práctica hasta la fecha parece ser la iluminación LED blanca o azul (38) o la mezcla de ambas en la proporción de 3:1 a 7000 lx ($\sim 95 \mu\text{mol}$ de fotones $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Estas condiciones promueven cambios morfológicos de células vegetativas verdes a células de quistes rojos (71). Se encontró que la irradiación óptima inferior estaba influenciada por otras condiciones de estrés, como la deficiencia de nutrientes (38) o la temperatura elevada (67). Esto demuestra que para la inducción efectiva de carotenogénesis, la irradiación excesiva puede no ser necesaria si existen otros factores estresantes (52) (43).

1.8 Fotobiorreactores

Un biorreactor es un espacio en el que se puede desarrollar un microorganismo u organismo en condiciones controladas y adecuadamente manejadas para diferentes fines. Existe un sinnúmero de biorreactores, ya que estos varían en diseño y tamaño, dependiendo del tipo de organismo que se busca desarrollar. En el caso de las microalgas, al tratarse de organismos fotoautótrofos, el tipo de biorreactores que se utilizan son los denominados “fotobiorreactores”, los cuales a su vez varían en cuanto a su diseño.

Uno de los fotobiorreactores más utilizados es la columna de burbujeo. Las columnas de burbujeo agitan el medio sin agitación mecánica, son útiles para el cultivo de células que tienen una resistencia mecánica débil, porque las células no sufren altas velocidades de cizalladura alrededor de los “impellers” en recipientes con agitación. Cuando se utiliza para el cultivo de células fotosintéticas, la circulación de líquido en la columna de burbujeo va hacia arriba en una región central y hacia abajo en una región cercana a la pared lo que permite la flotación de las células y proporciona ciclos de iluminación claros y oscuros con una alta intensidad de luz cercana a la pared. Además, las altas tasas de transferencia de masa en la columna de burbujas facilitan la absorción de dióxido de carbono que es una fuente de carbono en cultivos fotoautótrofos y la eliminación del oxígeno producido fotosintéticamente que suprime la fotosíntesis. Por lo tanto, la columna de burbujas puede ser un fotobiorreactor prometedor para el cultivo de algas (72) (73) (74) (75) (76).

Capítulo 2

Materiales y métodos.

En el presente capítulo se muestran los métodos y materiales utilizados durante el periodo experimental de la tesis, los cuales hicieron posible el desarrollo del presente trabajo experimental y se vio reflejado en los resultados correspondientes al capítulo 3.

2.1 Lugar de ejecución.

Esta investigación fue realizada en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, en los laboratorios H-202 (Laboratorio del Proyecto Mercurio), H-203 y H-401 (Laboratorio de Neurociencia y Biología Molecular), Laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas.

2.2 Materiales.

2.2.1 Reactivos.

1. AAPH.
2. Fluoresceína sódica.
3. Trolox.
4. Na_2HPO_4
5. NaH_2PO_4
6. β -ciclodextrina metilada (RMCD).
7. NaNO_3
8. NaH_2CO_3
9. EDTA.
10. Cloruro Férrico.
11. Ácido cítrico.
12. CaCl_2
13. MgSO_4
14. K_2HPO_4
15. H_3BO_3
16. MnCl_2

17. ZnSO_4
18. CuSO_4
19. MoNH_4
20. NaCl
21. Acetato de Sodio.
22. Agar.
23. Alcohol de 96%.
24. Lejía.
25. Acetona.
26. Acetato de etilo.
27. Dimetilsulfóxido (DMSO).
28. Etanol absoluto.
29. Butilhidroxianisol (BHA).

2.2.2 Biológicos.

1. *Haematococcus pluvialis*.

2.2.3 Equipos.

1. Lector de placas Varioskan LUX -ThermoFisher.
2. Termociclador Eppendorf Realplex2.
3. Autoclave.
4. Estufa.
5. Baño sonicador.
6. Balanza analítica.
7. Potenciómetro.
8. Luxómetro.
9. Lámpara UV.
10. Centrifuga para tubos Eppendorf.
11. Centrifuga para butirómetro de Gerber.
12. Microscopio.

2.2.4 Vidrio.

1. Matraces Erlenmeyer 250 mL y 500 mL.

2. Beakers de 250 mL, 500 mL y 1000 mL.
3. Pipetas de 5 mL y 10 mL.
4. Baguetas.
5. Probeta de 100 mL y 500 mL.
6. Fiolas de 2 mL, 5 mL, 10 mL, 50 mL.
7. Embudos.
8. Frascos con tapa.
9. Placas Petri.
10. Canal para micropipeta multicanal.
11. Tubos de ensayo.
12. Tubos de ensayo con tapa.
13. Cámara de Neubauer.
14. Portaobjetos y cubreobjetos.
15. Botellas de vidrio.

2.2.5 Otros.

1. Fotobiorreactores air-lift.
2. Bombas de aire.
3. Jeringas.
4. Cintas de luces LED.
5. Fluorescente de luz LED.
6. Lámpara con foco LED.
7. Manguera de pecera.
8. Llave de tres vías.
9. Difusor de pecera.
10. Bombas de pecera.
11. Tubos Eppendorf de 1.5 mL.
12. Tubos falcon de 15 mL y de 50 mL.
13. Placas para termociclador.
14. Placas para lector de placas.
15. Film para placa de termociclador.
16. Micropipeta de 250 μ L y de 1000 μ L.
17. Micropipeta multicanal de 250 μ L.

18. Tips azules (1000 μ L) y amarillos (250 μ L).

2.3 Métodos.

2.3.1 Diseño de los fotobiorreactores “air-lift”.

Para el diseño de los fotobiorreactores air-lift, se tomó en cuenta los siguientes criterios.

1. Su tamaño debe ser a escala de laboratorio.
2. Al tratarse de un “air-lift”, o columna de burbujeo, este tuvo una relación altura-diámetro (H/D) cercana o mayor a 3.
3. Este tiene que tener un consumo de energía mínimo, por lo que se optó por usar luces LED (light-emitting diode).

Teniendo en cuenta todo esto, se procedió a hacer un diseño preliminar del biorreactor a construir, el cual está constituido por 3 partes básicas: un vessel (recipiente de contenido), dos HP (*head plates*) y 4 puertos. Los cuales a su vez soportaron las siguientes partes del biorreactor:

El vessel contuvo el material biológico y su respectivo medio y el espacio de cabecera, así como el difusor de aire y la manguera de toma de muestra.

En cuanto a los head plates, uno sirvió de soporte (el inferior), mientras que el superior servirá de soporte para los puertos. Ambos estuvieron unidos por unos “gusanos” (tornillos largos), lo que creo una unión final de *head plates* con el vessel.

Los puertos fueron 4: un puerto por el cual ingresara la manguera de aireación, la cual a su vez tendrá el difusor de aire conectado; un puerto de toma de muestra, el cual contara con un mecanismo de llave de tres vías para su uso adecuado; un tercer puerto que tendrá un filtro de aire, y que servirá como “off-gas” (fuga de aire) y finalmente un cuarto puerto auxiliar el cual podrá servir para lo que se estime necesario.

2.3.2 Ensayo ORAC.

2.3.2.1 Preparación de stocks y reactivos.

2.3.2.1.1 Preparación del buffer fosfato.

Para preparar el buffer fosfato se siguió el siguiente procedimiento:

-Primero se hizo los cálculos respectivos para hallar los pesos correspondientes de sal y ácido.

Buffer fosfato 75 mM (pH: 7.4).

$$pH = pKa + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

$$7.4 = 7.199 + \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

$$0.201 = \log \frac{[sal]}{[ácido]}$$

$$\frac{1.5885}{1} = \frac{[sal]}{[ácido]}$$

$$\rightarrow 1.5885x + 1x = 0.075M$$

$$x = \mathbf{0.02897}$$

Na₂HPO₄ (sal) 141.9 g/mol

$$0.046 \frac{mol}{L} \times 141.9 \frac{g}{mol} \times 0.25L = 1.6319g$$

NaH₂PO₄ (ácido) 137.99 g/mol

$$0.0289 \frac{mol}{L} \times 137.99 \frac{g}{mol} \times 0.25L = 0.9994g$$

Se peso las cantidades calculadas y se disolvió en este caso en 250 mL de agua destilada. Luego se midió el pH con un potenciómetro y se procedió a ajustar el pH con una solución de NaOH hasta llegar a un pH de 7.4. Finalmente se filtró y se envasó en un frasco, previamente rotulado.

2.3.2.1.2 Preparación de solución stock de fluoresceína sódica.

Para preparar la solución stock de fluoresceína primero se pesó 0.00395 g del reactivo: Fluorescein sodium powder (Merck), y se disolvió en 25 mL de buffer fosfato, obteniendo así una solución de fluoresceína sódica a 4.2×10^{-4} M. Esta solución se alicuotó en tubos Eppendorf de 1.5 mL (como se puede apreciar en la Figura 5) y se guardó a una temperatura de -20°C (por un máximo de 2 meses)



Figura 5: Alicuotas de stocks de Fluoresceína.

2.3.2.1.3 Preparación de solución stock de Trolox.

Se preparo una solución stock de Trolox 5mM, para esto se pesó 0.005 g del reactivo Trolox (Sigma Aldrich), y se disolvió en 2 mL de buffer fosfato. Se uso el vortex para una dilución completa del reactivo. Finalmente, se alicuoto en tubos Eppendorf de 1.5 mL (500 μL) en cada tubo y se guardó a -20°C (por un máximo de 4 meses).

2.3.2.2 Evaluación de la capacidad antioxidante de muestras hidrofílicas (ORAC-H).

Para preparar el ensayo ORAC-H se procedió de la siguiente manera: Primero, se preparó una solución 0.153 M de AAPH, para esto se pesa 0.2074 g del reactivo y se disolvió en 5 mL de buffer fosfato (fiola de 5 mL). Una vez disuelto y enrazado adecuadamente se guardó en el

refrigerador (3°C) hasta su uso (la preparación de la solución de AAPH y su uso debe ser en el mismo día). Luego se procedió a prender el equipo y programar el ensayo correspondiente (ver subtítulo: Preparación del equipo). Seguidamente se preparó las soluciones a diferentes concentraciones de Trolox, para esto se siguió el siguiente procedimiento:

Se utilizó una de las alícuotas de Trolox previamente preparadas, se deja descongelar hasta que se encuentre completamente líquida, luego se procedió a colocar en 4 fioles de 5 mL previamente lavados y rotulados las siguientes cantidades del stock de Trolox: 10 µL, 20 µL, 40 µL y 80 µL, se enrasó hasta el volumen correspondiente (5 mL) y así se obtuvo soluciones de Trolox a las siguientes concentraciones respectivamente: 10, 20, 40 y 80 µM.

Luego se procedió a preparar la solución de trabajo de fluoresceína a partir de la solución stock previamente preparada y guardada, para esto se descongela por completo el stock y se hace las siguientes diluciones:

Primero se colocó 40 µL del stock en una fiala de 10 mL y se enrasó. Luego a esta nueva solución se le volvió a diluir (50 µL en una fiala de 5 mL) hasta llegar a una concentración final de 1.68×10^{-8} M.

Una vez obtenida la fluoresceína de trabajo se protegió con papel aluminio y no se expuso directamente a la luz.

Una vez preparado todo lo anterior se procedió a cargar los pocillos de la placa previamente definidos y descritos en el software del equipo Varioskan LUX y en la Tabla 1.

Primero se cargó 150 µL de la solución de fluoresceína en todos los pocillos a ser leídos por el equipo, luego se colocó: en el caso del pocillo del blanco 25 µL de buffer fosfato, en el caso de los estándares 25 µL del estándar correspondiente (St1= St 10 µM de Trolox, St2= St 20 µM de Trolox, y así sucesivamente) y en el caso del pocillo de la muestra, 25 µL de la muestra diluida adecuadamente.

Tabla 1: Procedimiento para el cargado de pocillos en la placa de lectura para el ensayo ORAC.

	Blanco	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Muestra
Fluoresceína (μL)	150	150	150	150	150	150
Buffer fosfato (μL)	25	0	0	0	0	0
Trolox Std. (μL)	0	25	25	25	25	0
Muestra (μL)	0	0	0	0	0	25
<i>Agitación por 10 minutos a 37°C, previamente programado en el equipo.</i>						
AAPH (μL)	25	25	25	25	25	25
<i>Inicio de la lectura en el equipo, a 37°C y una lectura cada minuto.</i>						

Una vez cargadas las cantidades indicadas se insertó en el equipo la placa, y empezó la agitación, pasados los 10 minutos de agitación se sacó la solución de AAPH guardada en el refrigerador y se cargó con una micropipeta multicanal 25 μL a cada pocillo. Finalmente, el equipo continuo con el protocolo establecido y empezó sus lecturas correspondientes (24) (77) (78) (79) (80).

2.3.2.3 Evaluación de la capacidad antioxidante de muestras lipofílicas (ORAC-L).

La técnica para realizar el ensayo ORAC para antioxidantes lipofílicos (ORAC-L) es muy similar a la anteriormente descrita con la diferencia en que a esta técnica se le introdujo la molécula de β-Ciclodextrina metilada (RMCD), con el fin de obtener una dilución completa del antioxidante lipófilo de interés en el medio acuoso propio del ensayo ORAC. Para esto se prepara previamente una solución de RMCD al 7% (p/v) diluida en una solución de agua-acetona (1:1), hay que tener en cuenta que la proporción final debe ser 1:1 de agua: acetona.

Se diluyo la solución stock de Trolox a una nueva solución de 500 μM luego de esto, se colocó a cada tubo Eppendorf 10, 20, 40 y 80 μL. Una vez preparados los tubos que contenían el blanco y los estándares se procedió a agregar a los tubos de muestra (con solución de RMCD) una

alícuota de muestra diluida, para este caso se agregó un total de 50uL al volumen de 250 μ L de preparado de RMCD llegando a un volumen final de 300 μ L, y previamente se diluyo la muestra con acetona (1:5). Finalmente se colocan todos los tubos preparados en un *shaker* para tubos Eppendorf por 1 hora a 400 RPM. Terminado este tiempo se sigue el mismo procedimiento anteriormente descrito (Tabla 1) (81) (82) (83).

2.3.3 Construcción de los fotobiorreactores “air-lift”.

Para la construcción de los fotobiorreactor *air lift*, se compró primero recipientes de vidrio en forma cilíndrica, los cuales cumplían con la relación H/D requerida, luego de esto, se tomó las medidas correspondientes y se mandó a hacer los *head plates*, los cuales fueron hechos con barras de poliamida cortadas a las medidas requeridas, una vez obtenidas las “tapas” se llevó a que fueran trabajadas por un tornero, para que este haga los cortes correspondientes, así como los canales para que el vessel repose y encaje adecuadamente, en ese momento se aprovechó también para hacer los respectivos agujeros para que pasen los “gusanos”.

Finalmente se inició la segunda parte de la construcción del fotobiorreactor, el cual utilizo como tubos de entrada y salida, mangueras de pecera, además de eso se usó a lo largo de la parte experimental dos tipos de difusores: las piedras difusoras comunes (cilíndricas) y difusores en forma de “U” metálicos; los cuales, a su vez, fueron aireados por bombas de pecera. Para el sistema de toma de muestra se utilizó una llave de tres vías conectada al final del puerto de toma de muestra (exteriormente) y se le colocó dos jeringas, una de ellas cumplió la función de extraer el aire contenido en la porción de manguera con la que trabaja, y la otra de extraer muestras directamente del fotobiorreactor. Para el “off-gas” se utilizó filtros de medio de cultivo celular, los cuales previamente fueron esterilizados y luego reutilizados. Finalmente, la fuente de luz a utilizar fueron unas cintas LED que consistían en 4 porciones unidas por conectores, los cuales a su vez están unidos a un conversor de energía enchufado directamente a corriente eléctrica, este

dispositivo contenía un sensor para ser utilizado a control remoto, con el cual se podía variar hasta en 10 niveles la intensidad de luz, así como los colores que podía proporcionar esta cinta LED. El fotobiorreactor construido, ensamblado y trabajando se puede apreciar en la Figura 6 (73)(84).



Figura 6: Fotobiorreactor construido.

2.3.4 Cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*.

2.3.4.1 Preparación del medio BG11.

Para la preparación del medio BG-11, primero se preparó 4 stocks (85).

El stock 1 contiene:

- EDTA en una concentración de 0.1 g/L
- Cloruro férrico en una concentración de 0.6 g/L
- Ácido cítrico en una concentración de 0.6 g/L
- Cloruro de calcio en una concentración de 3.6 g/L

El stock 2 contiene:

- Sulfato de magnesio en una concentración de 7.5 g/L

El stock 3 contiene:

- Fosfato monobásico de potasio en una concentración de 4g/L

El stock 4 contiene:

- Ácido bórico en una concentración de 2.86 g/L
- Cloruro de manganeso en una concentración de 1.81 g/L
- Sulfato de zinc en una concentración de 0.222 g/L
- Sulfato de cobre en una concentración de 0.079 g/L
- Amonio molibdato en una concentración de 0.018 g/L

Los cuatro stocks fueron independientemente preparados, se calentó hasta disolver completamente y luego se autoclavó. Se guardó en el refrigerador hasta su uso.

Para finalmente obtener medio BG-11 se pesa 1.5 g/L de nitrato de sodio y 0.02 g/L de Carbonato de Sodio, se agrega los stocks como sigue (indicaciones para preparar 1 litro):

- 10 mL del stock 1.
- 10 mL del stock 2.
- 10 mL del stock 3.
- 1 mL del stock 4.

Se enrasó a 1 litro, se ajusta el pH de ser necesario (pH: 7 – 7.5) y se autoclavó.

Cuando se preparó medio BG-11 sólido se siguió las mismas indicaciones con la diferencia de que al final se le agrega 20 g de Agar por cada litro de medio.



Figura 7: Preparación de medio BG-11 sólido.

2.3.4.2 Preparación de la cepa.

La cepa de *Haematococcus pluvialis* fue obtenida de la empresa “Andexs Biotechnology”, la cepa en un inicio estaba enquistada (estadio rojo) para lo cual se colocó en frascos de vidrio estériles con medio BG-11 para que en condiciones normales el estadio rojo pase a estadio verde y de esta forma se reproduzcan adecuadamente.

Para esto se hizo tres diluciones del cultivo obtenido (1:2, 1:5 y 1:10) y se hizo nuevos cultivos en medio BG-11 sólido, para empezar el aislamiento de la cepa.

2.3.4.2.1 Aislamiento de la cepa.

Para aislar la cepa de *Haematococcus pluvialis* se empezó sembrando en placas con medio sólido y se empezó a hacer repiques de las colonias que presentaban las características tanto morfológicas como microscópicas, se hizo hasta 6 repiques hasta llegar a placas donde el crecimiento de microalgas en su mayoría era de *H. pluvialis*. A las colonias que crecieron en estas placas se les fueron aislando y guardando en tubos Eppendorf con agua previamente autoclavada, y se continuó haciendo el aislamiento, se observa por ejemplo en la Figura 8 que la presencia de células de

Haematococcus pluvialis enquistadas y otras células las cuales pueden ser células de la misma especie de microalga o bien una cepa distinta.

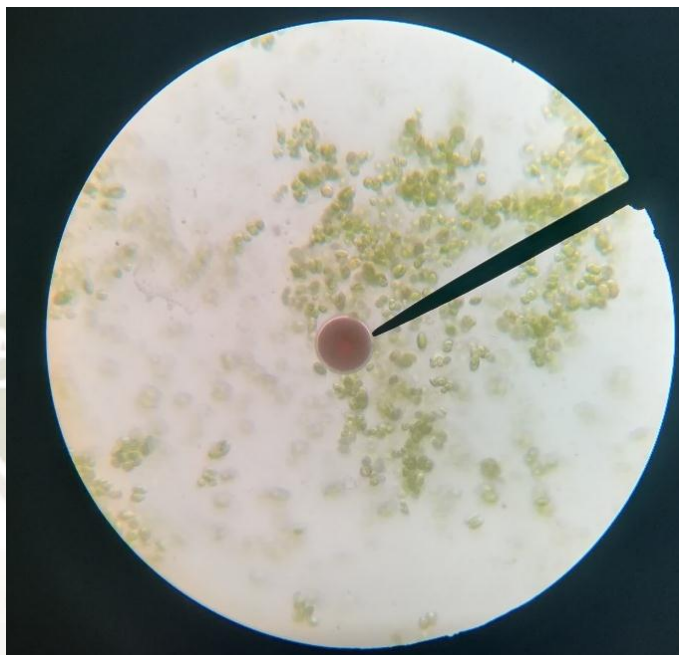


Figura 8: Vista microscópica de muestra inicial de la cepa *H. pluvialis*.

2.3.4.2.2 Obtención de quistes de *Haematococcus pluvialis*.

Para la obtención de células enquistadas de *H. pluvialis* se preparó medio BG-11 modificado, reduciéndole la cantidad de nitrato de sodio 10 veces, logrando así obtener que la cepa en placa sólida se enquistara aproximadamente al día 15 a 20 (Figura 9).

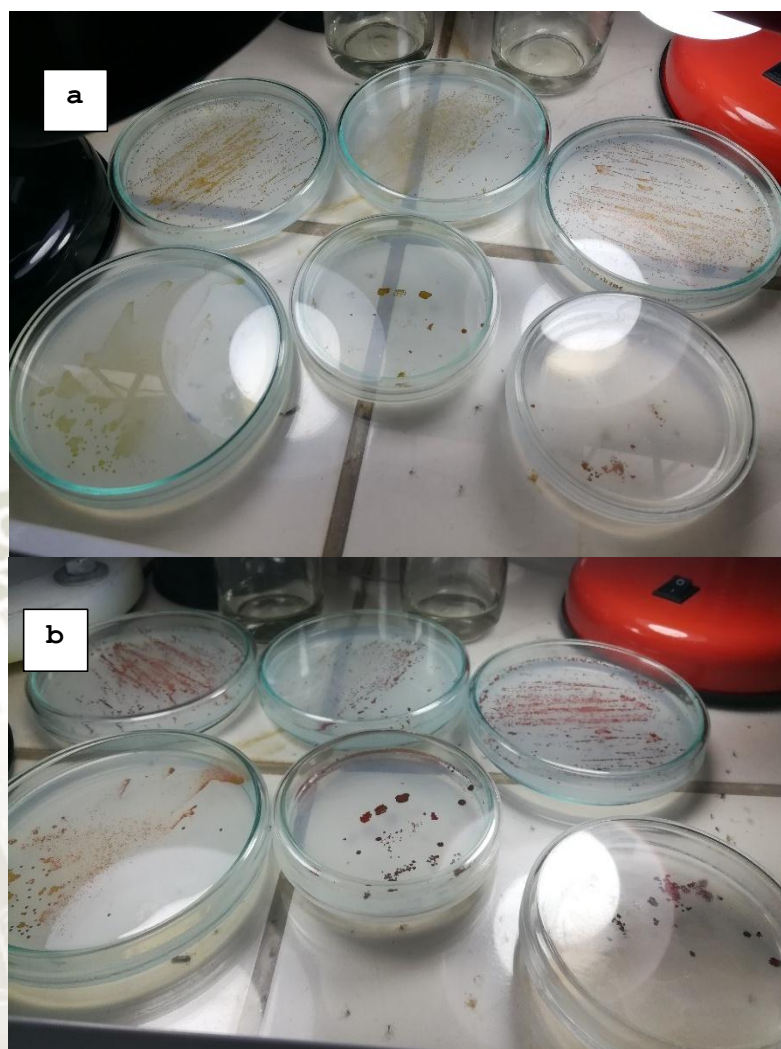


Figura 9: (a) Primeros días de cultivo de la microalga *H. pluvialis* en medio sólido modificado, nótese el color verde de las cepas. (b) Mismos cultivos, 2 semanas después, nótese el color rojo de las cepas.

2.3.4.3 Funcionamiento de los biorreactores.

Una vez preparado el medio, se procedió a preparar el biorreactor donde se depositó el medio respectivo, así como la cepa, para esto primero se lavó el vessel, se enjuago con agua destilada y luego se le enjuago con alcohol, se esperó a que este evapore y luego se puso bajo la lámpara UV por un periodo de 30 minutos, boca arriba y a 5 cm de distancia de esta. Junto al medio que se esterilizo en el autoclave (en un matraz, el volumen depende de la cantidad de medio que se preparó), se colocó el HP superior con los tubos, el filtro, y el sparger.

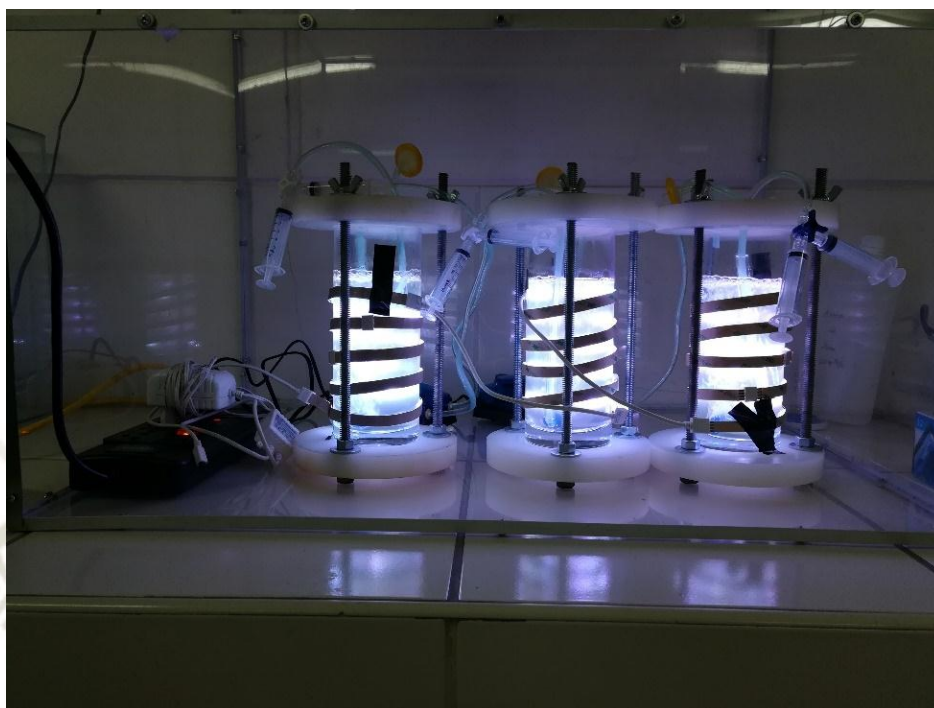


Figura 10: Funcionamiento de los fotobiorreactores contruidos al simultaneo.

2.3.4.4 Curva de crecimiento.

Para realizar la curva de crecimiento se utilizó 3 fotobiorreactores, como se muestra en la Figura 10, al mismo tiempo y se retiró muestras diarias de 1 mL aproximadamente (por duplicado).

Se hizo la curva de crecimiento utilizando 3 métodos: Conteo celular con cámara de Neubauer, determinación de absorbancia a 688nm y determinación de biomasa seca (86)(87). Para eso se siguió los siguientes pasos respectivamente:

- Conteo celular en cámara de Neubauer.

Para este conteo se utilizó una cámara de Neubauer de una profundidad de 0.100 mm y un área de 0.0025 mm². El conteo se hizo por duplicado para cada biorreactor. Se tomo con una micropipeta una cantidad determinada de muestra y se colocó en la cámara para su posterior conteo, las muestras conforme fueron

pasando los días fueron aumentando de concentración (como se puede apreciar en la Figura 11), por lo tanto, se empezó a hacer diluciones (1:5, 1:10, 1:20, 1:25). El conteo se hizo en los cuadrantes exteriores (4 cuadrantes) y se hizo un conteo por duplicado, obteniendo así conteo de 8 cuadrantes (4 cuadrantes por cada repetición) en total, para los cuales se hizo el siguiente cálculo para determinar la concentración de celular:

$$cell / ml = \left(\frac{C1 + C2 + C3 + C4}{4} \right) \times (f.C) \times (f.D)$$

Donde:

C: Cuadrante.

f.C: Factor de conversión.

f.D: Factor de dilución.

El factor de conversión para esta cámara fue: 10000

- Determinación de absorbancia a 688 nm.
Se hizo también una curva de crecimiento determinando la absorbancia de las muestras diluidas a una longitud de onda de 688 nm (longitud de onda de mayor absorbancia de la clorofila). Para esto se hizo siempre una dilución 1:5 antes de colocar la muestra en el espectrofotómetro (la dilución fue hecha con agua destilada).

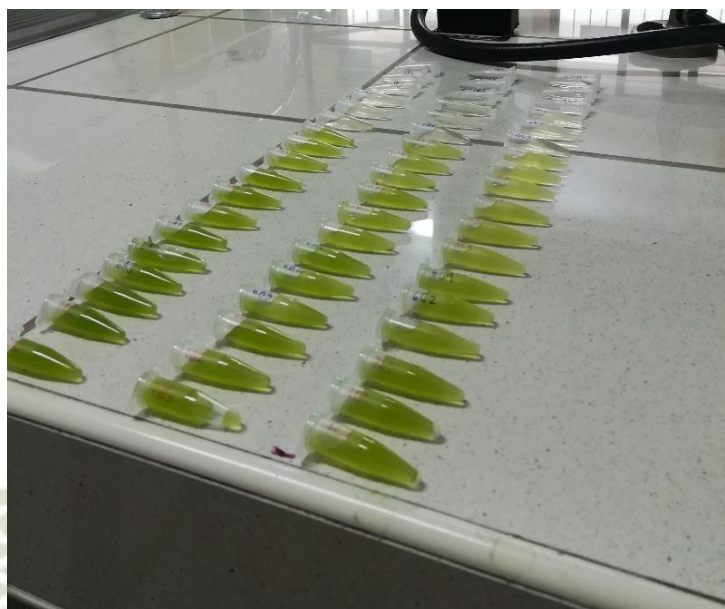


Figura 11: Tubos Eppendorf con muestras diarias colocadas en orden de acuerdo con el día de muestreo.

- Determinación de biomasa seca.

Para hacer la curva por biomasa se preparó primero tubos Eppendorf de 1.5 mL nuevos, se rotularon, se secaron por un periodo de 2 horas a 70°C en la mufla y se pesaron cuidadosamente (el peso se tomó cuando el tubo llegó a temperatura ambiente, para esto se deja reposando en un desecador por un periodo de 15 minutos), el peso obtenido se tomó como peso inicial. Luego a estos tubos se les colocó 1mL de muestra homogénea proveniente de los tubos de muestreo diario, se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos y se llevó a la estufa con la tapa abierta, a una temperatura de 70 °C por 24 horas, al final de este tiempo se transfirió nuevamente los tubos al desecador para que estos llegaran a temperatura ambiente y se volvió a pesar, el peso obtenido fue el peso final. El cálculo para obtener el valor de biomasa diario fue:

$$\text{Biomasa total} = \text{Peso final} - \text{Peso inicial}$$

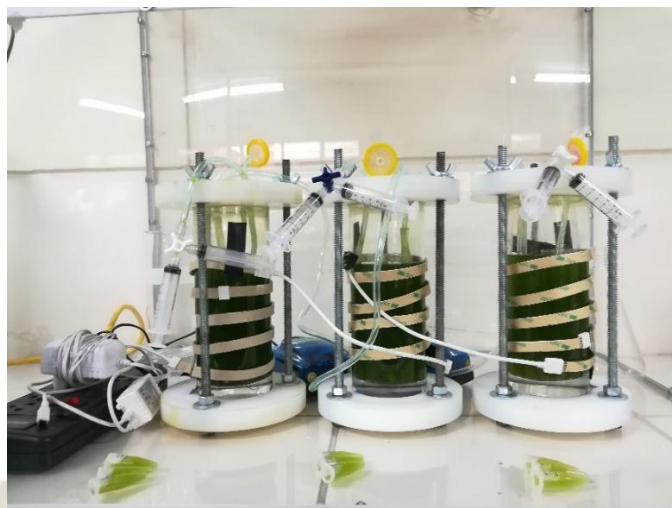


Figura 12: Foto de los fotobiorreactores en uso y al momento de muestreo para realizar las curvas de crecimiento.

2.3.5 Obtención de extractos.

2.3.5.1 Separación de la biomasa.

Una vez obtenidas colonias estresadas de *Haematococcus pluvialis* en los medios sólidos, se procedió a extraer colonia por colonia y colocarlas en agua destilada estéril en un tubo Falcon. Una vez separadas la mayor cantidad de colonias se procedió a colocar el contenido en tubos Eppendorf para luego centrifugarlos a 3000 rpm por 5 minutos. Finalmente se colocaron los tubos en la estufa a una temperatura de 70°C por aproximadamente 4 horas.



Figura 13: Foto de las colonias suspendidas en agua destilada estéril listas para ser centrifugadas y luego secadas en una estufa.

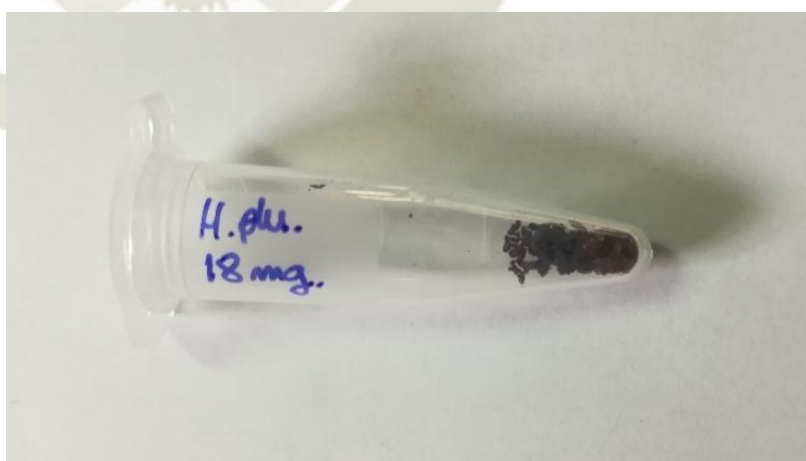


Figura 14: Células secas de la microalga *H. pluvialis*.

2.3.5.2 Obtención de extractos a partir de células secas de *Haematococcus pluvialis*.

2.3.5.2.1 Extracto con acetato de etilo – etanol.

Se peso 18mg de células secas de *H. pluvialis* y se preparó una solución de acetato de etilo: etanol. La relación de células: solvente, fue de 20:1 (p/v). Luego se colocó en baño ultrasonido por 16 minutos a una temperatura de 41°C. Luego de esto se centrifugo por 10 minutos a 8500 rpm (ver Figura 15) y se recuperó el sobrenadante, el precipitado se volvió a tratar de la misma forma y se recuperó un segundo sobrenadante(88) (89) .

2.3.5.2.2 Extracto con acetona.

Para la extracción con acetona se siguió el mismo procedimiento descrito en el acápite previo, solo que en este caso se remplazó el solvente de extracción por acetona (90). Ambos extractos fueron rotulados y guardados adecuadamente a -20°C.

2.3.5.2.3 Extracto con dimetilsulfóxido.

Primero se procedió a pesar 20mg de células secas de *Haematococcus* y se colocó en un tubo Eppendorf, se agregó 500 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y se sonicó por una hora en el baño sonicador a una temperatura de 65°C (ver Figura 16), luego se centrifugo por 5 minutos a 10000 RPM y se recuperó el sobrenadante, luego al pellet obtenido se le volvió a agregar 300 µL de DMSO se repitió el mismo procedimiento. En total se recuperó un total de 750 µL de extracto, el cual fue recuperado en un tubo Eppendorf y guardado adecuadamente a -20°C (91). Se siguió el mismo procedimiento para hacer los extractos de las microalgas obtenidas tras el funcionamiento de los fotobiorreactores (ver Figura 17).



Figura 15: Extracto obtenido utilizando la mezcla de acetato de etilo y etanol, nótese el color naranja leve.



Figura 16: Extracto obtenido con DMSO, nótese el color rojo intenso obtenido.

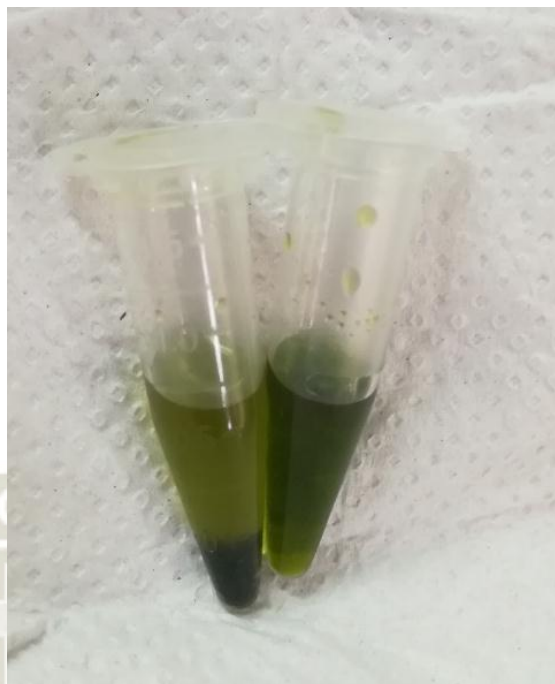


Figura 17: Extractos obtenidos con DMSO, a partir de las microalgas recolectadas luego del uso de los fotobiorreactores.

2.3.6 Preparación del equipo.

El lector de placas Varioskan LUX cuenta con varios tipos de determinación espectrofotométricas, para efectos de este trabajo se escogió la opción “Fluorescencia” para nuestra determinación de la capacidad antioxidante utilizando el ensayo ORAC.

Se colocó los pasos a seguir en el equipo, para esto el equipo pide primero el orden a seguir para la medición, se seleccionó el más adecuado según la disposición de los pocillos, luego se agregó los siguientes pasos (seleccionándolos en el menú superior del software):

- Primero “Agitar” donde pide tiempo de agitación, tipo de agitación (continua o pulsada) y velocidad y fuerza de agitación. En esta sección se insertó un tiempo de 10 minutos, agitación continua, y velocidad y fuerza de agitación de 60 rpm y baja.
- Segundo “Placa afuera”

-Tercero “Pausar”, donde se seleccionó la opción acción del usuario, lo que hace que el usuario de la orden de en qué momento la pausa termina.

-Cuarto “Placa adentro”

-Quinto “Bucle cinético”, en este paso primero se selecciona la duración que se definió en términos de “tiempo total”, para el caso del ensayo ORAC se colocó 2 horas y 30 minutos. Luego de esto se tuvo definir el intervalo cinético que en este caso es de 1 minuto (1 lectura cada minuto), luego se selecciona la opción que dice: “agitación entre lecturas”, en tipo de agitación se seleccionó: “continua” y finalmente en la sección “velocidad y fuerza de agitación” se colocó 60 rpm y baja, respectivamente.

Dentro de este paso (bucle cinético) se añade la función “Fluorescencia” donde se tuvo que insertar los siguientes datos:

Longitudes de onda:

- Excitación (nm): 485
- Emisión (nm): 518
- La opción “varias longitudes de onda” deseleccionada.
- Tiempo de medición: 100 ms
- Óptica: superior
- Ancho de banda de excitación: 12 nm

-Sexto, una vez finalizada la parte del protocolo se procedió a insertar los pasos a seguir para el análisis de datos (obtención de las áreas bajo la curva (AUC) y la respectiva curva de relación estándares versus AUC. Para esto se insertan las opciones del menú en el siguiente orden (en el paso “Resultados”, subsección “Fluorescencia”):

-Promedio, DS, CV%

-AUC Reducción cinética (en esta opción, en la sección “tipo de cálculo” seleccionar “Integral”)

-Sustracción del blanco.

-Curva estándar.

2.3.7 Pruebas preliminares.

2.3.7.1 Ensayo ORAC en el termociclador para PCR en tiempo real: Realplex².

Se hicieron pruebas preliminares en un inicio con el termociclador Realplex². Para esto se siguió el protocolo descrito anteriormente con la diferencia de que en este equipo no se pueden programar ciertos pasos como la extracción de placa o agitación entre lecturas, para esto se preparaba primero los pocillos con la solución de fluoresceína obtenida más los estándares de Trolox y se agitaba con un vortex y una superficie plana por un periodo de 10 minutos, luego se colocaba en el equipo para luego adicionar el AAPH y dar inicio al ensayo.

2.3.7.2 Ensayo ORAC en el lector de placas Varioskan LUX.

Para hacer el ensayo ORAC en este lector de placas se tomó en cuenta los procedimientos descritos en los puntos 2.4.4 y 2.3.2.2. Luego se procedió a hacer una prueba preliminar muestras de jugo de naranja, vino y campari.

Para esta prueba preliminar se prepararon 4 estándares de Trolox (10, 20, 40 y 80 μ M) y las 3 muestras de diluyeron 1:100.

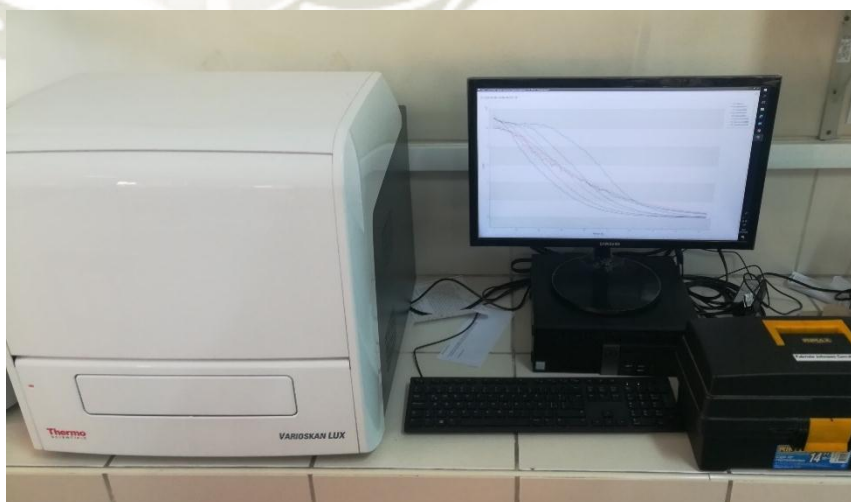


Figura 18: Lector de placas Varioskan LUX.

2.3.7.3 Ensayo ORAC-L para el BHA.

Para hacer esta prueba preliminar se siguió los procedimientos descritos en los puntos 2.4.4 y 2.3.2.3. Se preparó dos muestras de Butilhidroxianisol (BHA) diluidas 1:50 y 1:100, de una solución inicial de 0.5 gr en 20 mL.

2.3.7.4 Pruebas preliminares de ensayo ORAC-L de diferentes extractos antioxidantes de *Haematococcus pluvialis*.

Se realizó pruebas preliminares de los extractos obtenidos, descritos en el punto 2.4.3.2, y se siguió el procedimiento descrito en los puntos 2.4.4 y 2.3.2.3.

2.3.8 Ensayo ORAC-H de extractos con DMSO de la microalga *Haematococcus pluvialis* y de microalgas obtenidas en los fotobiorreactores.

Se realizó el ensayo ORAC para los extractos obtenidos después de seguir el procedimiento descrito en el punto 2.4.3.2.3 y se siguió el procedimiento descrito en los puntos 2.4.4 y 2.3.2.2.

2.3.9 Ensayo ORAC-L de extractos con DMSO de la microalga *Haematococcus pluvialis* y de microalgas obtenidas en los fotobiorreactores.

Se realizó el ensayo ORAC para los extractos obtenidos después de seguir el procedimiento descrito en el punto 2.4.3.2.3 y se siguió el procedimiento descrito en los puntos 2.4.4 y 2.3.2.3.

Capítulo 3

Resultados y Discusión.

3.1 Diseño de los fotobiorreactores “air lift”

El diseño hecho en el software Autodesk Inventor, de los fotobiorreactores construidos se muestra en la Figura 19. Se utilizó las medidas reales para hacer el mencionado diseño, obteniendo así la versión digital del diseño propuesto.

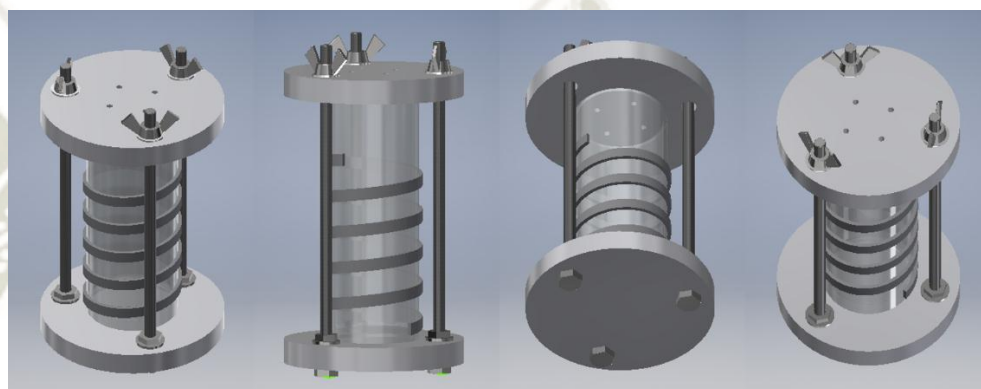


Figura 19: Diferentes vistas del diseño del fotobiorreactor a construir (elaboración propia).

El plano del fotobiorreactor construido se encuentra en el Anexo 2.

3.2 Curva de crecimiento después del uso de los fotobiorreactores.

Se trabajó con los 3 biorreactores construidos y mencionados en el acápite 2.4.2.3, con estos se obtuvo tres curvas de crecimiento producto del conteo celular en cámara de Neubauer, absorbancia a 688nm y peso seco de la biomasa, donde por ejemplo se puede observar que al día 3 (Figura 19) hay una concentración celular (células/mL) promedio de 7.55×10^6 (conteo celular), al día 8 una concentración celular promedio de 2.83×10^7 . Es exactamente entre este día (día 8) y el siguiente (día 9) donde según el gráfico de ratios de crecimiento (Figura 20) se produce el crecimiento más acelerado observado en este estudio. Se puede observar en la curva de crecimiento obtenida por conteo celular (Figura 19) que para el día 18 a 19 se llega a una fase estacionaria de crecimiento y donde además el ratio de crecimiento disminuye desde esos días en adelante (Figura 20). Se puede observar algo muy similar en la curva

obtenida por absorbancia (Figura 21) donde se observa un comportamiento parecido en cuanto a los ratios de crecimiento (Figura 22), en este caso los intervalos de días que presenta mayor aceleración son los de 4-5 y 5-6 días. En cuanto a la curva de crecimiento por biomasa (Figura 23) se observa un comportamiento similar a los casos anteriores en los biorreactores B y C, el biorreactor A en cambio muestra un comportamiento ligeramente distinto. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta última técnica puede presentar errores debido a las cantidades con las que se trabaja, si bien es cierto se tuvo mucho cuidado al momento de trabajar con los tubos se puede observar que la curva obtenida en este caso irregular en comparación con las primeras dos curvas obtenidas. Si bien es cierto cada curva de crecimiento depende directamente del rendimiento del biorreactor, de la cepa y del medio utilizado; los resultados obtenidos en esta parte de la investigación son similares a los obtenidos por Zuo et. al., quienes trabajan con la microalga *Chlorella ellipsoidea* (92), observándose que en este estudio la cepa con la que trabajan llega a su fase estacionaria alrededor del día 19, sin embargo como ya se mencionó esto puede variar de cepa en cepa, y también dependiendo del fotobiorreactor utilizado, sin embargo tener la curva de crecimiento de una cepa de una microalga ayuda a saber más acerca de su proceso de crecimiento proporcionándonos información valiosa para futuros tratamientos como por ejemplo el estrés oxidativo con diferentes factores externos, los cuales deben ser aplicados cuando la cepa se encuentra en su estado estacionario.

Durante el conteo celular se notó que las microalgas que proliferaban variaban de forma y tamaño, y conforme fueron pasando los días las microalgas que más predominaban según lo observado eran aquellas que coincidían con la descripción microscópica de los géneros *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.*, lo cual indicaba que la cepa en un inicio había sido superada en velocidad de crecimiento por microalgas contaminantes. Estas microalgas son normalmente las más comunes contaminantes en cultivos de microalgas (93).

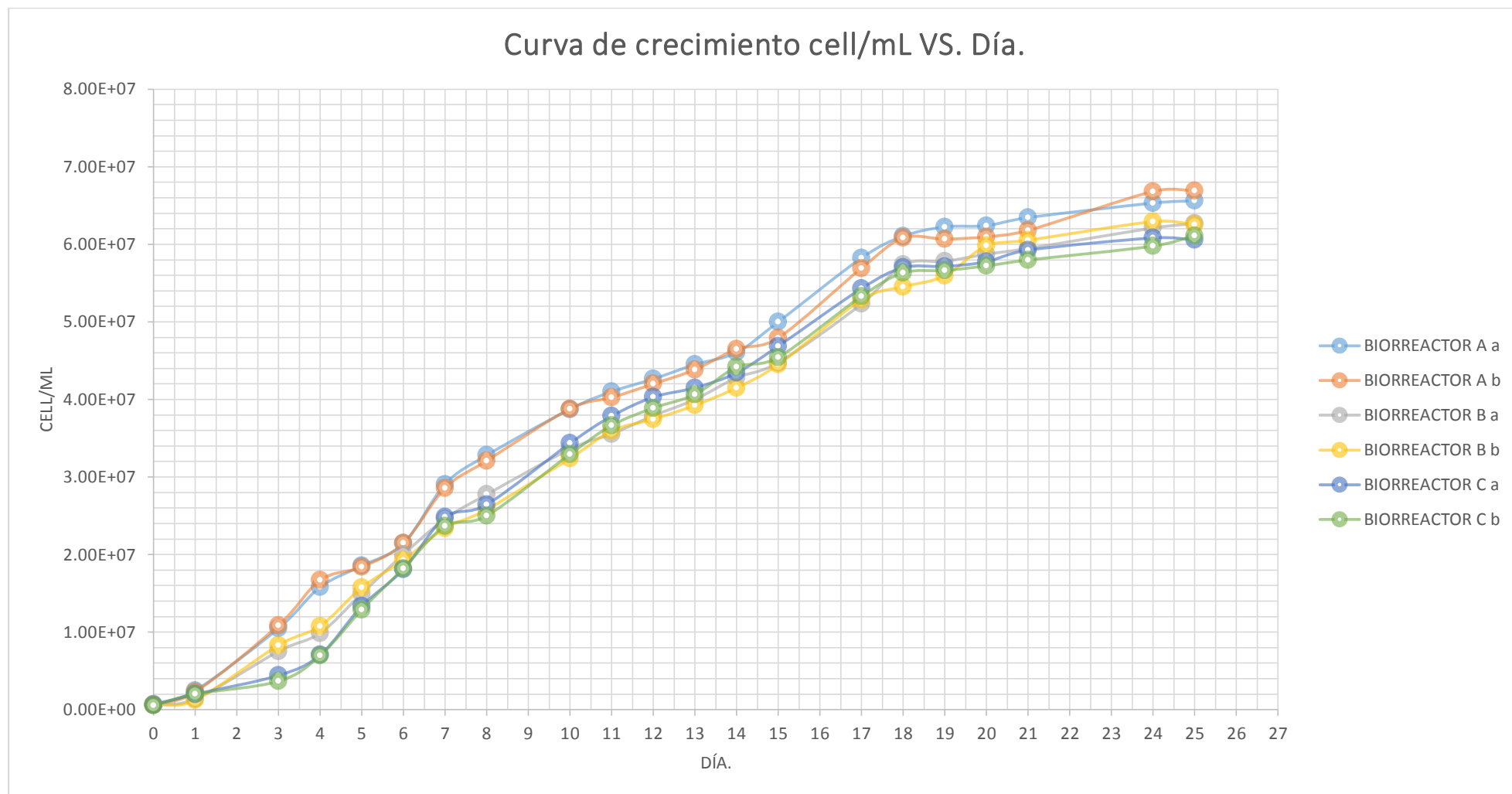


Figura 20: Curva de crecimiento obtenida por conteo celular después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.

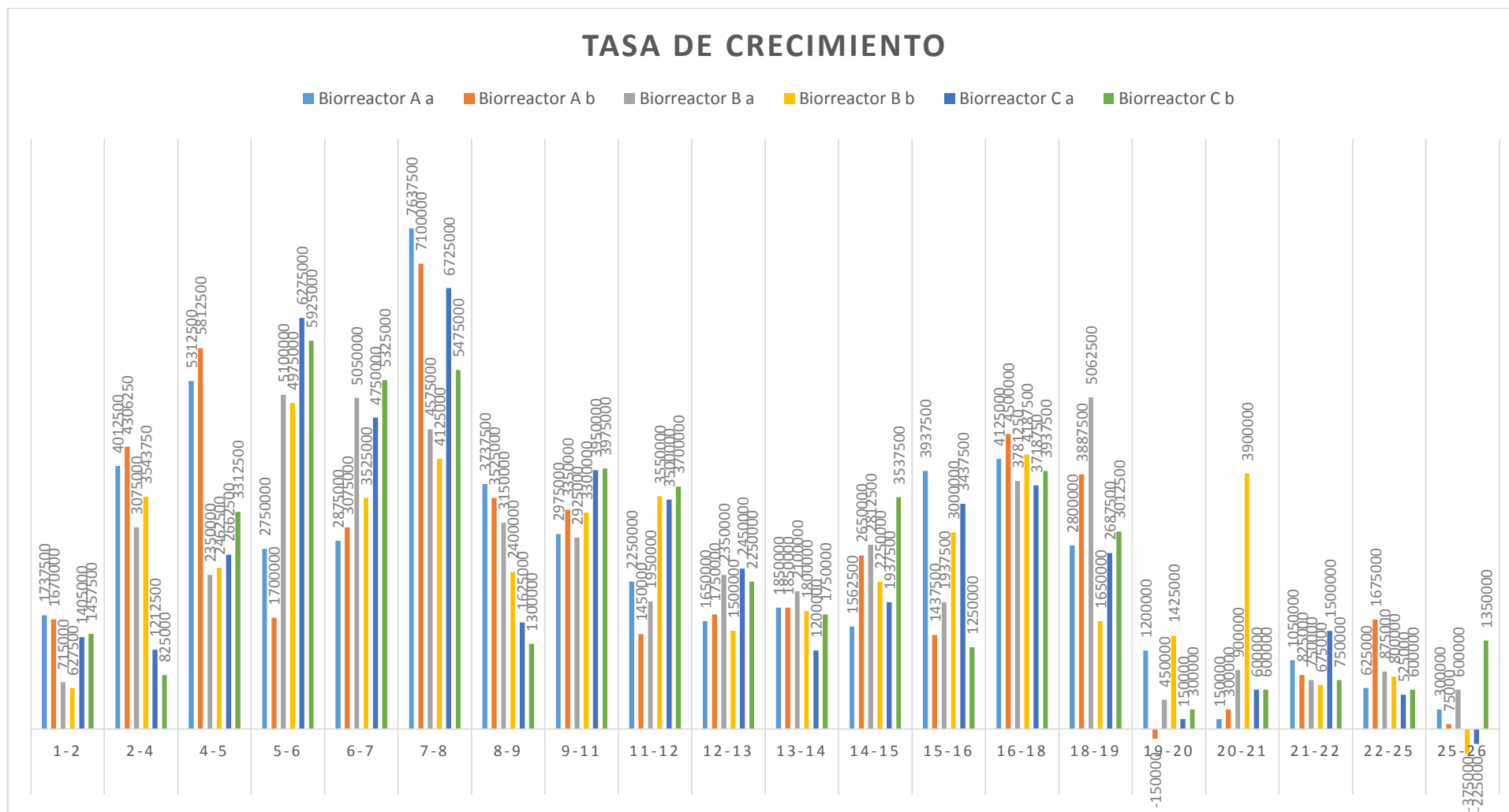


Figura 21: Tasa de crecimiento de la curva de crecimiento obtenida por conteo celular.

Curva de crecimiento *Haematococcus pluvialis* Abs VS. Día - 688 nm.

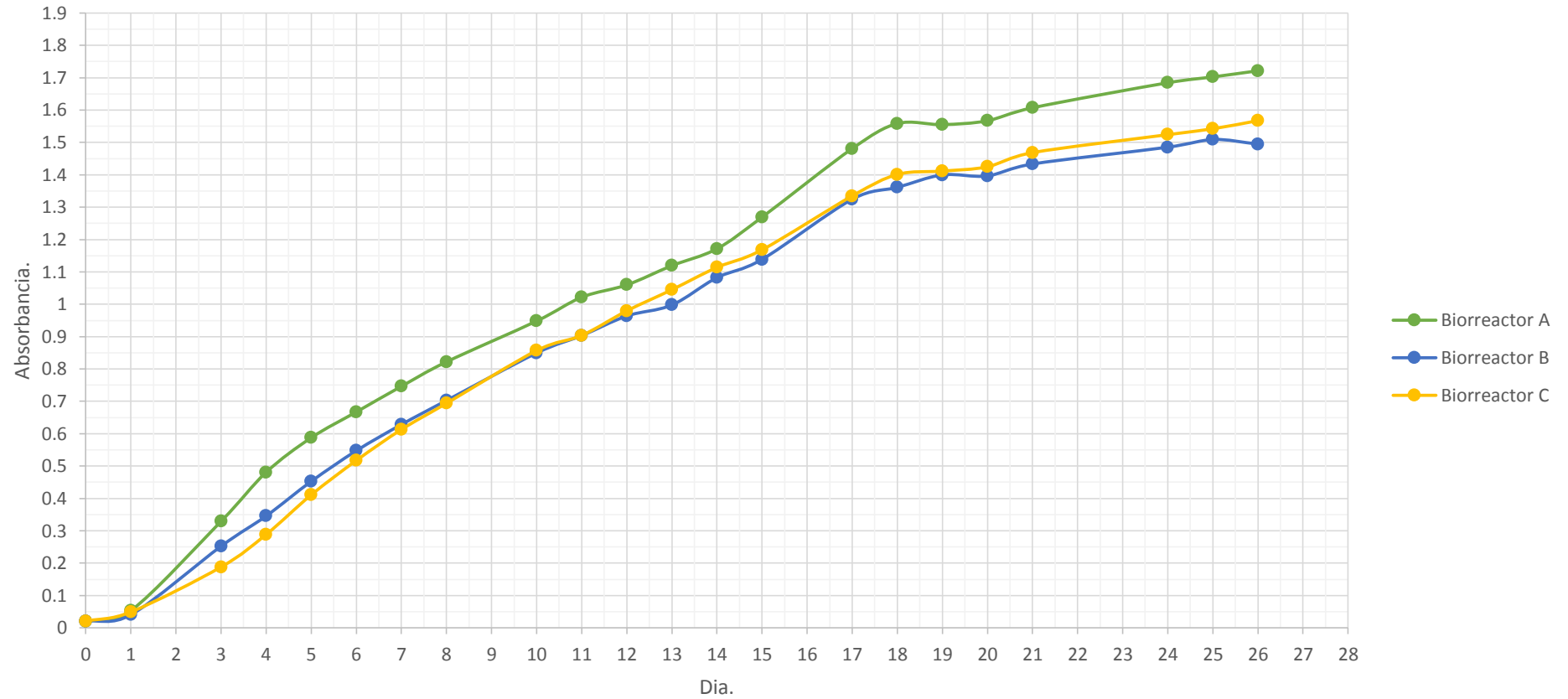


Figura 22: Curva de crecimiento obtenida por medición de absorbancia (688 nm) después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.

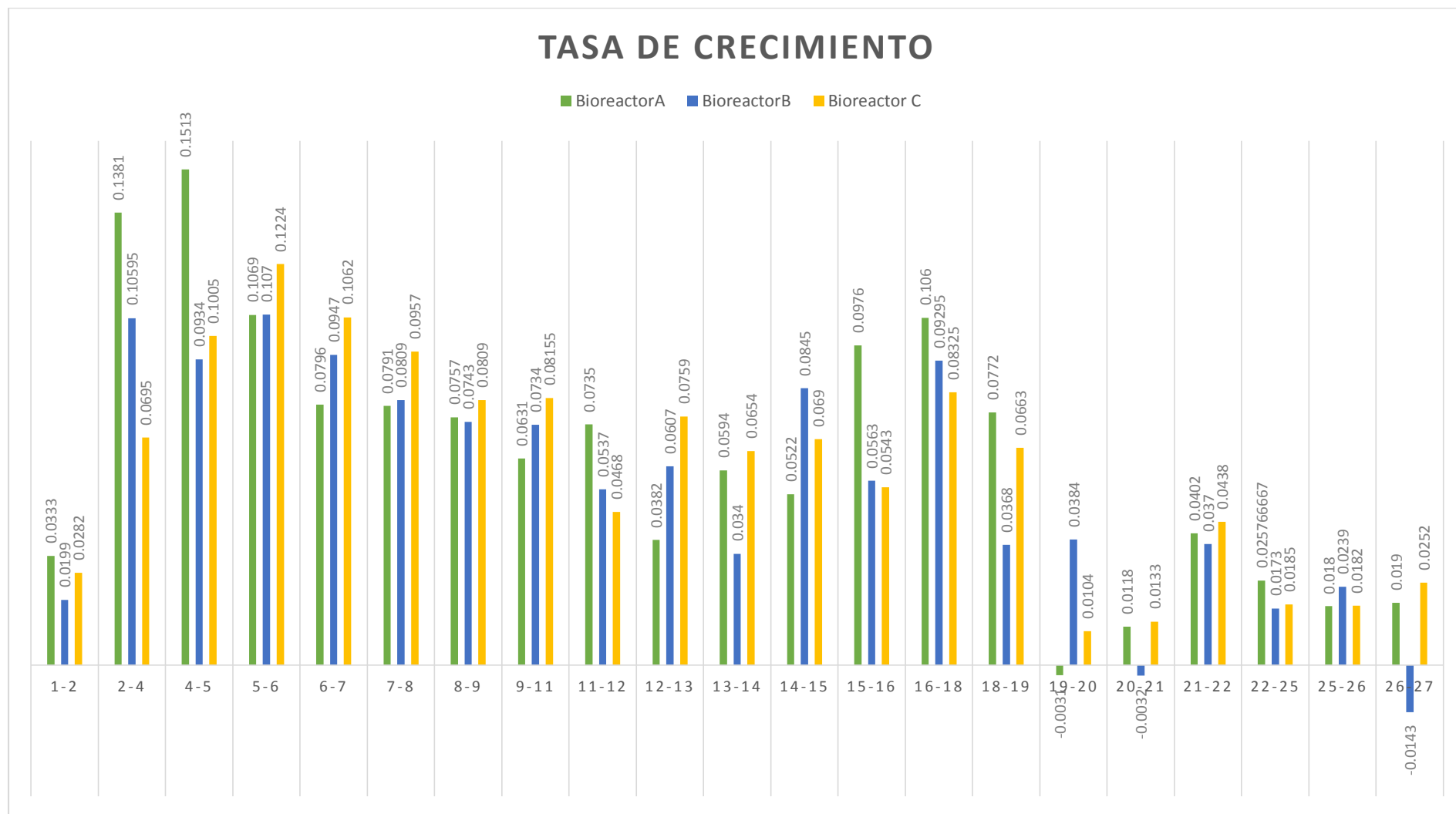


Figura 23: Tasa de crecimiento de la curva de crecimiento obtenida por medición de absorbancia.

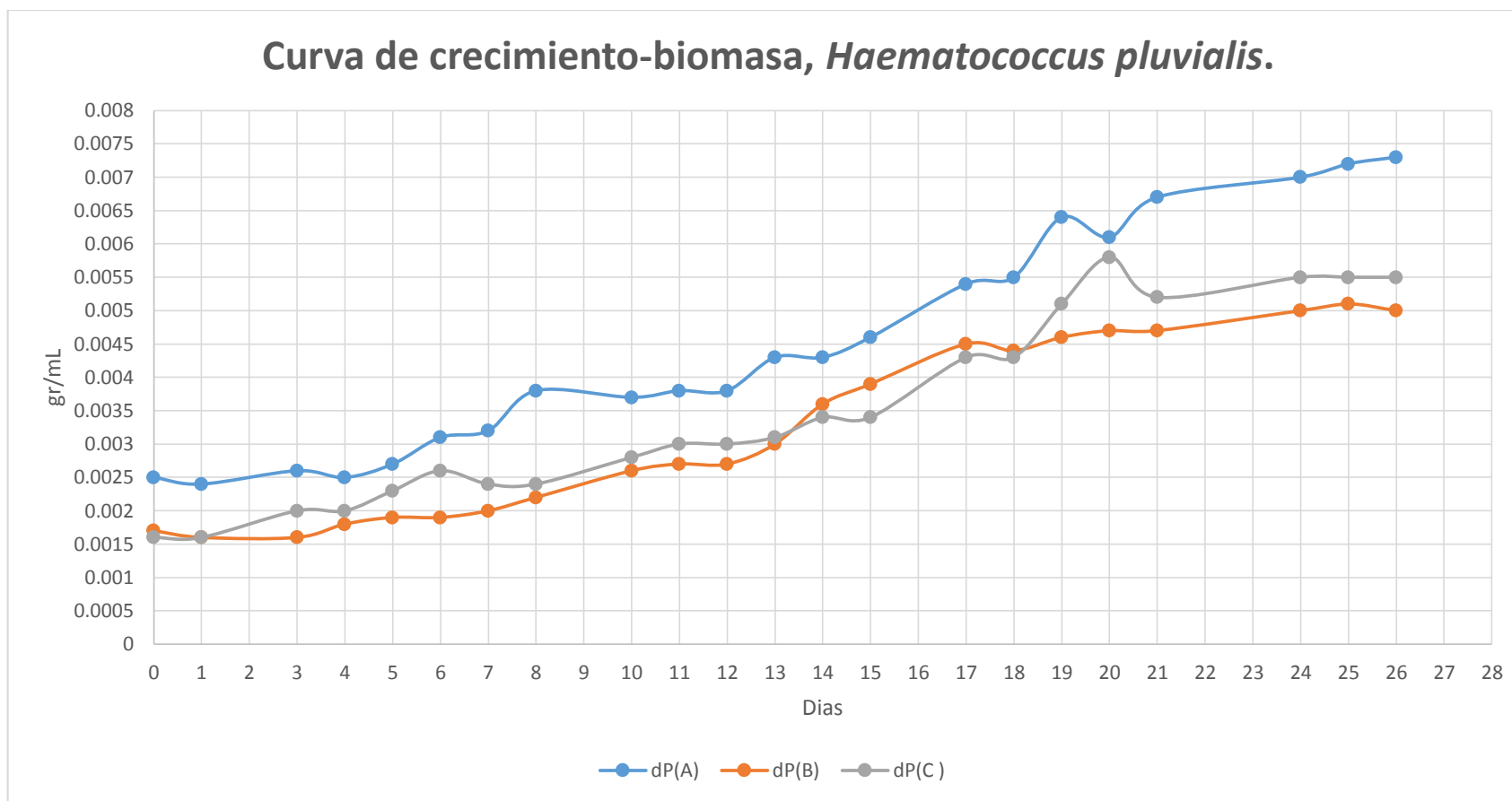


Figura 24: Curva de crecimiento obtenida por pesaje de biomasa seca después del uso de 3 fotobiorreactores durante 26 días.

3.3 Aislamiento de la cepa de *Haematococcus pluvialis* y obtención de quistes.

Una vez aislada la cepa de *Haematococcus* después de 6 repiques consecutivos se fueron obteniendo colonias rojas aisladas, las cuales fueron separadas adecuadamente y se colocaron en medio BG-11 modificado y se obtuvo así mayor cantidad de cepas estresadas al cabo de 14 días de cultivo y exposición a luz constante. Estas cepas fueron separadas en tubos Eppendorf como se mencionó en el capítulo anterior.

Durante el proceso de repique se observó que la cepa estuvo contaminada desde la fuente de inicio, con otras microalgas y probablemente con bacterias, basándose en la observación de las colonias que se formaron en las diferentes placas de cultivo. Se pudo observar asimismo utilizando un estereoscopio que aun así viendo macroscópicamente cepas rojas (estresadas) de *H. pluvialis*, estas colonias tenían muy cerca e incluso pegadas a ellas colonias de otras microalgas, dificultando su aislamiento y purificación.

Al notar esto se optó por continuar con un trabajo de aislamiento en placas progresivamente hasta obtener una cantidad suficiente para poder hacer extractos. Sin embargo, hasta esta parte de la metodología experimental se habían hecho ya funcionar los biorreactores construidos con una cepa de la cual se esperaba sea *Haematococcus pluvialis* aislado en su totalidad, pero como ya se mencionó, al hacer la observación en el microscopio se pudo observar que si bien es cierto existían células de *Haematococcus* en un estadio verde característico con dos flagelos en un extremo, o bien células en proceso de estrés que empezaban a generar un color rojo en su superficie, existían mayoritariamente otro tipo de células. Aun así, se terminó el trabajo de los biorreactores y se almacenó la cosecha obtenida, para luego poder hacer extractos también de estas microalgas.

3.4 Obtención de extractos.

Primero se realizó un extracto inicial con las células secas obtenidas (después del aislamiento de cepas en placas con medio sólido BG-11). Este primer extracto fue el realizado con el acetato de etilo- etanol, el cual presentó un color naranja claro. El siguiente extracto fue obtenido con acetona el cual presentó un color naranja muy parecido al primero obtenido con acetato de etilo y etanol. Finalmente se hizo

un extracto utilizando DMSO con el procedimiento previamente descrito y se obtuvo un extracto con un color rojo intenso, notoriamente diferente a los dos anteriores.

3.5 Pruebas preliminares.

3.5.1 Ensayo ORAC en el termociclador Realplex².

En un inicio del trabajo de investigación se realizó pruebas en el termociclador para PCR en tiempo real Realplex². Se intento primero lograr curvas de que generaran áreas y con las cuales posteriormente se pudieran generar rectas de relación concentración de Trolox versus áreas bajo la curva, sin embargo, se tuvo siempre un problema constante y fue que las rectas esperadas nunca salieron debido a varios factores:

En un principio hay que tener en cuenta que este equipo si bien es cierto cuenta con el mecanismo adecuado para medir una señal de fluorescencia no cuenta con ciertas funciones con las que si cuenta un lector de placas. Una de las más importantes es la agitación entre lecturas, en el caso del termociclador una vez cerrado el compartimiento que alberga la placa con los pocillos y muestras, ya no hay forma de agitar los pocillos de trabajo. Si bien es cierto se generaban las condiciones necesarias como temperatura y medición del decaimiento de fluorescencia, nunca se pudo obtener gráficos similares a los de un ensayo ORAC, una de las diferencias más notorias fue que por lo general la curva del blanco con relación a las curvas de los estándares, empezaba muy por debajo de estos (Figura 24), además se observó que el punto de inicio inclusive de los estándares era en diferentes puntos. Otra de las cosas que se observó fue que a un determinado tiempo, como se puede observar en la Figura 25, se formaban curvas con una forma distinta a los ensayos ORAC característicos observados en diferentes investigaciones (24)(79)(83)(80). Todos estos resultados llevaron a inducir que no se podría utilizar este termociclador como equipo para realizar nuestro ensayo ORAC.

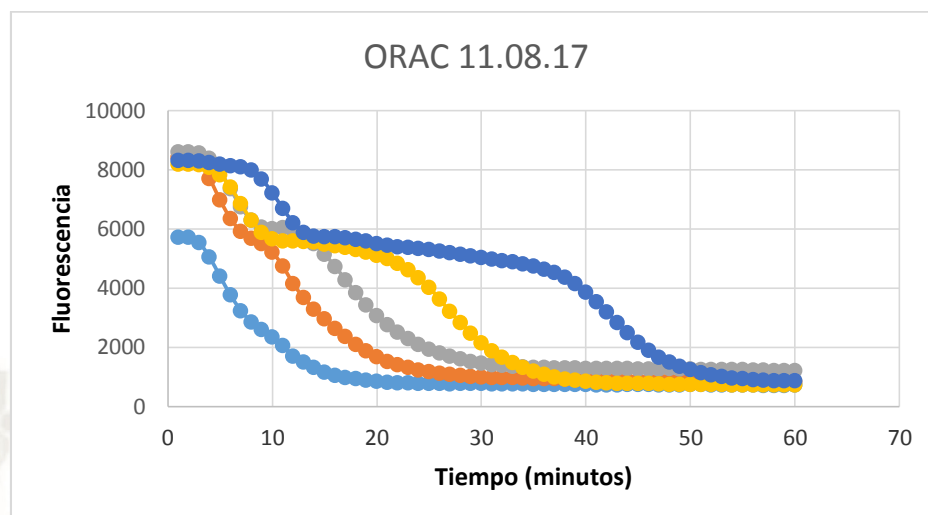


Figura 25: Curvas de estándares y blancos de Trolox para el ensayo ORAC (60 minutos), realizado en el termociclador Realplex2.

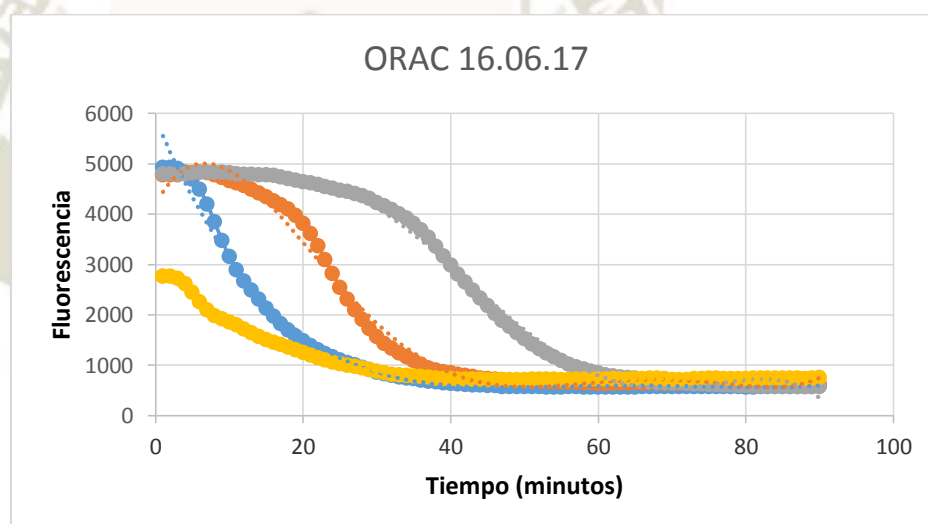


Figura 26: Curvas de estándares y blancos de Trolox para el ensayo ORAC (90 minutos), realizado en el termociclador Realplex2.

Es importante mencionar que hasta la fecha no se han encontrado referencia alguna en la que hayan utilizado un termociclador de este tipo para intentar realizar un ensayo ORAC.

3.5.2 Ensayo ORAC en el lector de placas Varioskan LUX.

Después de hacer las pruebas preliminares en el termociclador Realplex² se optó por hacer pruebas preliminares en el lector de placas Varioskan LUX. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En el primer intento se buscó primero lograr curvas del ensayo ORAC características, obteniendo así en el primer intento las curvas que se observa en la Figura 26. Como se observa notablemente hay diferencias entre esta gráfica obtenida y entre las gráficas mostradas en las Figuras 24 y 25. Donde se puede ver claramente que desde un inicio las curvas en el caso de la Figura 26 empiezan todos en un punto cercano y de ahí empiezan a decaer de acuerdo a su concentración de Trolox, en cambio en las Figuras 24 y 25 se ve que las curvas, especialmente la del blanco, inicia en un punto muy por debajo de las demás curvas. Por otro lado, las curvas obtenidas con este lector de placas presentan la forma característica de decaimiento del ensayo ORAC, las cuales generan las AUC (áreas bajo la curva) que se busca. Las diferencias entre ambos equipos son enumeradas en la Tabla 2.

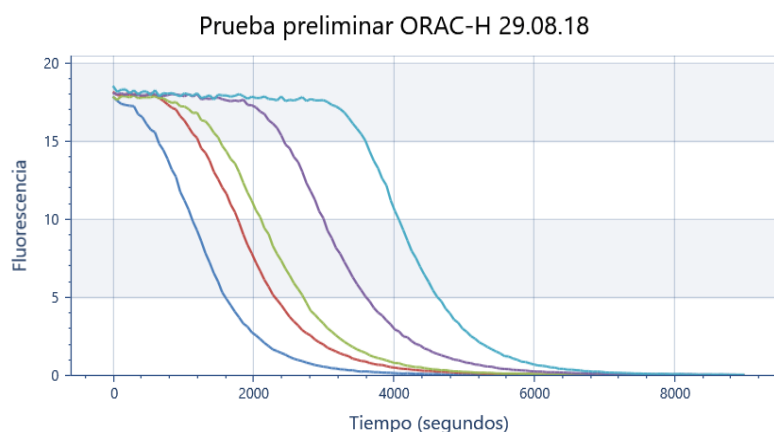


Figura 27: Curvas obtenidas del ensayo ORAC-H de la prueba preliminar 29.08.18.

Tabla 2: Tabla en la que se describe las principales diferencias entre los equipos: Realplex2 y Varioskan LUX al momento de desarrollar un ensayo ORAC.

Realplex2.	Varioskan LUX.
El punto de inicio de las curvas es desigual.	Las curvas inician en un mismo punto.
El blanco empieza muy por debajo de los estándares.	La curva del blanco empieza a decaer desde el mismo punto que el resto de las curvas.
Las curvas presentan un tipo distinto de caída al ensayo ORAC.	Las curvas obtenidas son las características del ensayo ORAC.
La recta de estándares vs. AUC no muestra la linealidad deseada.	Las rectas obtenidas están con un R cercano a la unidad.

A continuación del ensayo preliminar satisfactorio, se procedió a hacer un ensayo ORAC-H para muestras hidrofílicas, para esto se seleccionó tres muestras aleatorias: vino (merlot), jugo de naranja y Campari (un aperitivo). Para lo cual, se preparó 4 estándares de Trolox (10, 20, 40 y 80 μM) y diluciones 1:50 de las muestras aleatorias ya mencionadas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

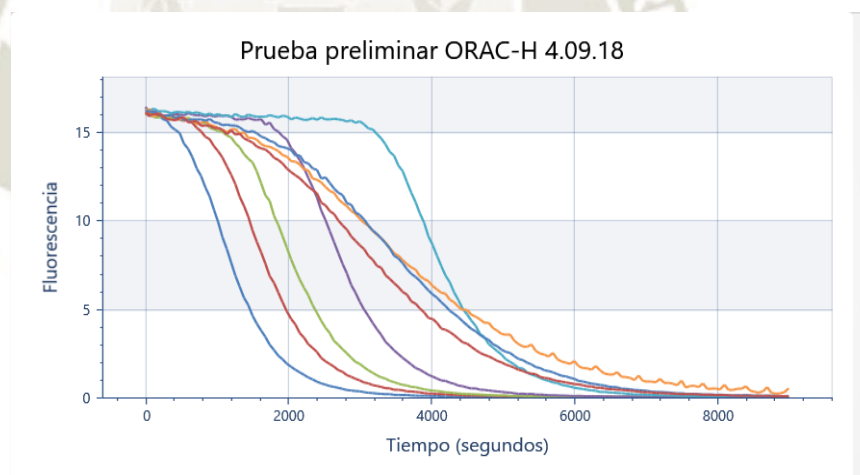


Figura 28: Curvas obtenidas del ensayo ORAC-H de la prueba preliminar con muestras de Campari (curva roja), vino (curva azul) y jugo de naranja (curva naranja).

Una vez obtenida las áreas bajo la curva de cada estándar (AUC) se les relaciona con su concentración correspondiente, y se obtuvo una recta de relación con un $r^2 = 1$ como se puede observar en la Figura 28.

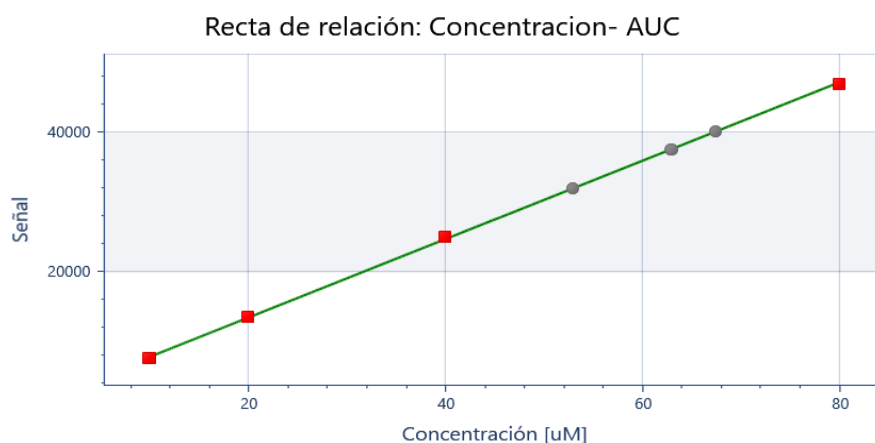


Figura 29: Recta de relación entre concentraciones de Trolox y áreas bajo la curva. En la recta también se ubican los puntos obtenidos por las áreas generadas por las muestras trabajadas.

Como las AUC obtenidas por las muestras se encuentran dentro de la recta de relación obtenida, utilizando la ecuación de esta recta se puede calcular los equivalentes Trolox (eq) de las muestras (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados obtenidos de la prueba preliminar del ensayo ORAC-H con muestras de naranja, vino y Campari.

	Concentración (μM)	AUC
Trolox	10	7870
	20	13480
	40	24690
	80	47110
Naranja	67.52 (eq)	40110
Vino F	62.97 (eq)	37560
Campari	52.97 (eq)	31960

Como se puede observar en este primer ensayo preliminar con muestras el equipo Varioskan LUX da todas las condiciones necesarias para que se pueda realizar el ensayo ORAC-H. Las curvas obtenidas empiezan todas en un mismo punto y al momento de obtener la curva de relación entre

AUC y concentraciones de Trolox se obtiene una linealidad cercana a la unidad. Por otro lado, comparando los resultados obtenidos especialmente el de jugo de naranja y comparando este resultado con el obtenido por Wang et. al., se puede observar que el valor reportado en esta prueba preliminar es notablemente más alto que el reportado en esta investigación antecedente, esto debido probablemente al tipo de naranja (94).

3.5.3 Ensayo ORAC para el BHA.

Una vez obtenidos los resultados mostrados en el punto 3.4.2 se procedió a desarrollar el ensayo ORAC-L (para antioxidantes lipofílicos). Para esto se hizo una prueba preliminar utilizando como muestra el BHA (butilhidroxianisol), este es un antioxidante de naturaleza lipofílica que se utiliza para prevenir la oxidación en cosméticos, previene el enranciamiento de grasas y aceites, este suele ser asociado al BHT (butilhidroxitolueno) (otro antioxidante lipofílico) (95), se diluyó adecuadamente en acetona como se describió en el punto 2.4.5.3. Como se puede ver en la Figura 29 el punto de inicio de cada curva difiere ligeramente (en comparación a los mostrados en el ORAC-H), esto debido quizá a la acetona, la cual hay que tener en cuenta es volátil, por otro lado, también puede deberse a los errores de pipeteo, este se dificulta con un solvente como la acetona, los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Figura 29 y 30:

Prueba preliminar ORAC-L 2.10.18

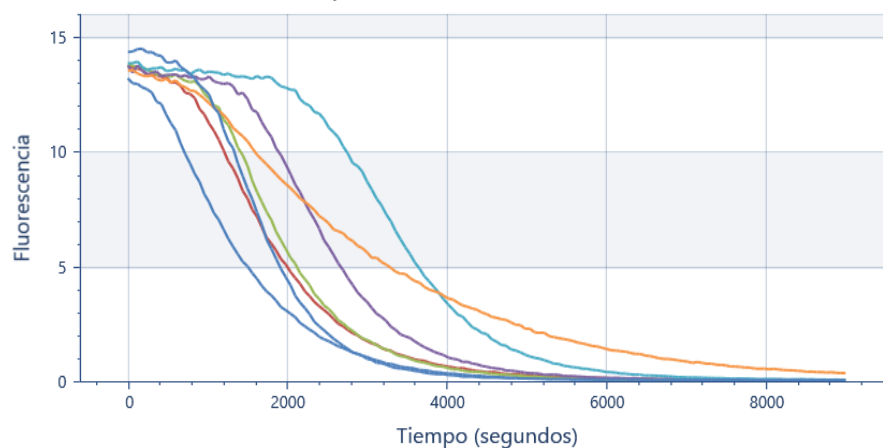


Figura 30: Resultados de la prueba preliminar para el ensayo ORAC-L con dos muestras de BHA diluidas 1:50 y 1:100.

Recta de relación: Concentraci3n- AUC

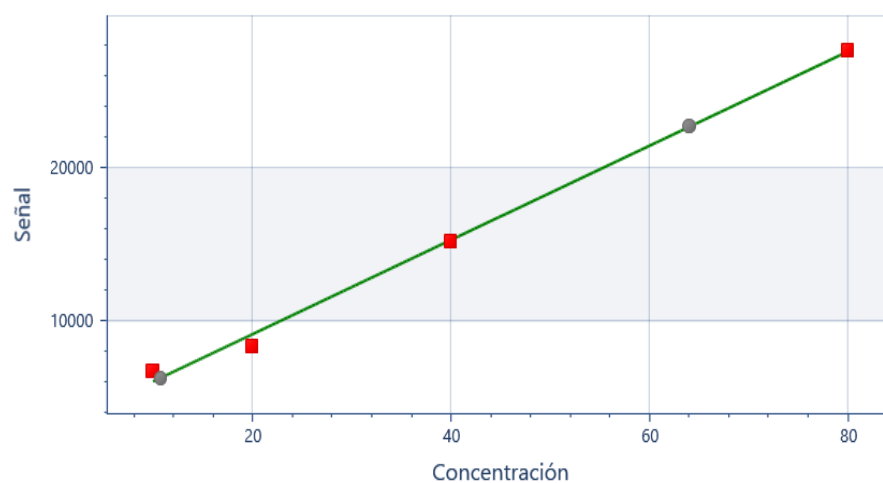


Figura 31: Recta de relaci3n entre las AUC obtenidas y las concentraciones de Trolox empleadas, para la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con muestras diluidas de BHA.

Tabla 4: Resultados obtenidos en la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con BHA.

	Concentración (μ M)	AUC
Trolox	10	6075
	20	9156
	40	15320
	80	27640
BHA (1:50)	10.73 (eq)	6299
BHA (1:100)	64.14 (eq)	22760

Se puede ver en los resultados obtenidos que el ensayo ORAC-L si da resultados esperados de capacidad antioxidante. Una las primeras cosas que hay que tener en cuenta es que se hizo esta prueba preliminar para comprobar el funcionamiento y la correcta introducción de la molécula de RMCD en el ensayo. Por otro lado, los resultados obtenidos son comparables a los obtenidos por Watanabe et. al. (96).

3.5.4 Ensayo ORAC de extractos obtenidos

Una vez concluidas las pruebas preliminares se procedió a trabajar con los extractos obtenidos según los procedimientos descritos en los puntos 2.4.2.2.1 y 2.4.2.2.2.

Se siguió el procedimiento antes ya descrito y se obtuvo los siguientes resultados para el extracto de etanol-acetato de etilo.

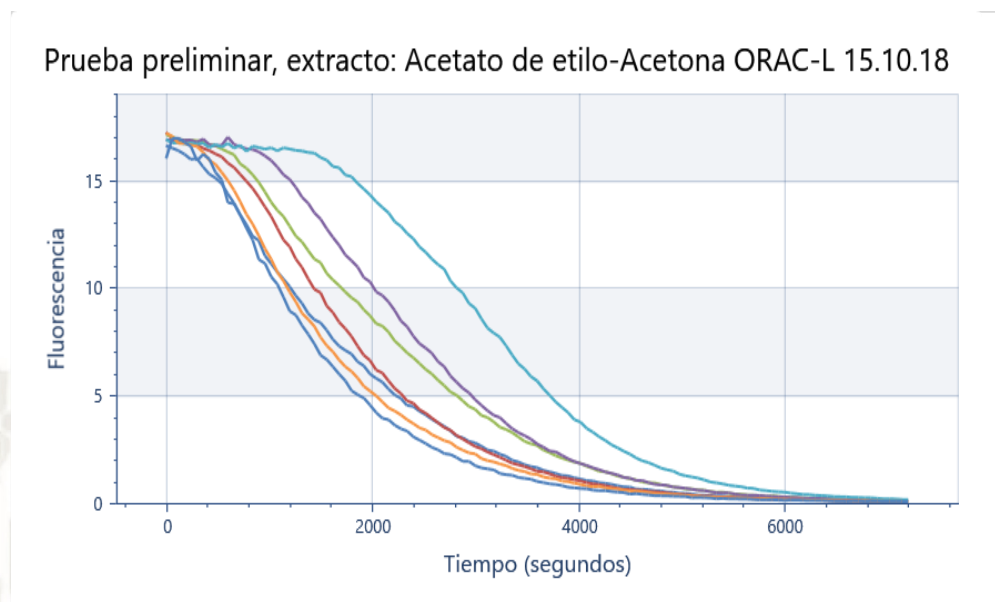


Figura 32: Gráfico del ensayo ORAC-L donde se buscó evaluar la capacidad antioxidante del extracto obtenido con acetona - acetato de etilo de la microalga *H. pluvialis*.

Como se puede ver en la Figura 31 las curvas generadas por las muestras (extractos) decaen entre el blanco y primer estándar (línea azul y roja, respectivamente), lo cual dificulta la medición de la capacidad antioxidante ya que las áreas generadas por las muestras no estarán dentro de las áreas generadas por los estándares. De acuerdo con el trabajo realizado por Huang et. al. para poder obtener un valor de capacidad antioxidante, el área obtenida tiene que estar entre los valores de áreas obtenidas con los estándares de Trolox (79).

Luego se procedió a hacer el ensayo ORAC-L para el extracto obtenido con acetona y se obtuvo el siguiente resultado:

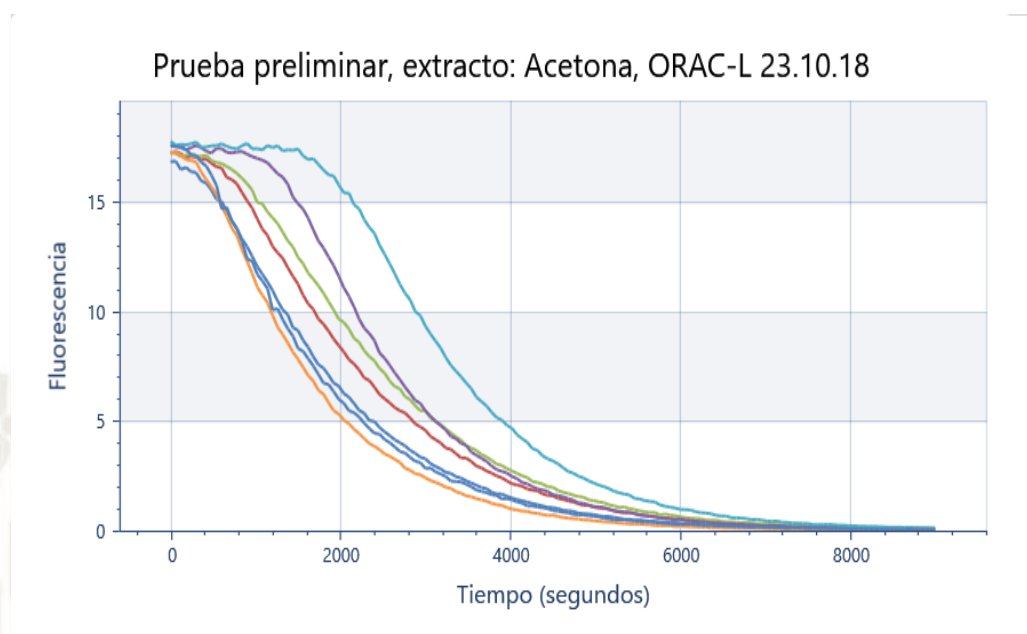


Figura 33: Gráfico del ensayo ORAC-L donde se buscó evaluar la capacidad antioxidante del extracto de la microalga *H. pluvialis* obtenido con acetona.

Como se puede observar en la Figura 32 los resultados obtenidos con este tipo de extracto no es el óptimo, ya que las curvas generadas por las muestras decaen inclusive por debajo del blanco (línea azul).

Es por eso por lo que se descartó este solvente de extracción. Al buscar más referencias se encontró el trabajo de Régner et. al. (91), y se contactó con la Dra. Graciela Pavon-Djavid, indicándonos que ellos utilizaron DMSO como solvente de extracción, es así que optamos por seguir el procedimiento ya descrito en el punto 2.4.3.2.3. Se hizo tres diluciones del extracto obtenido y finalmente se hizo el ensayo ORAC-L obteniendo en una primera instancia el siguiente resultado:

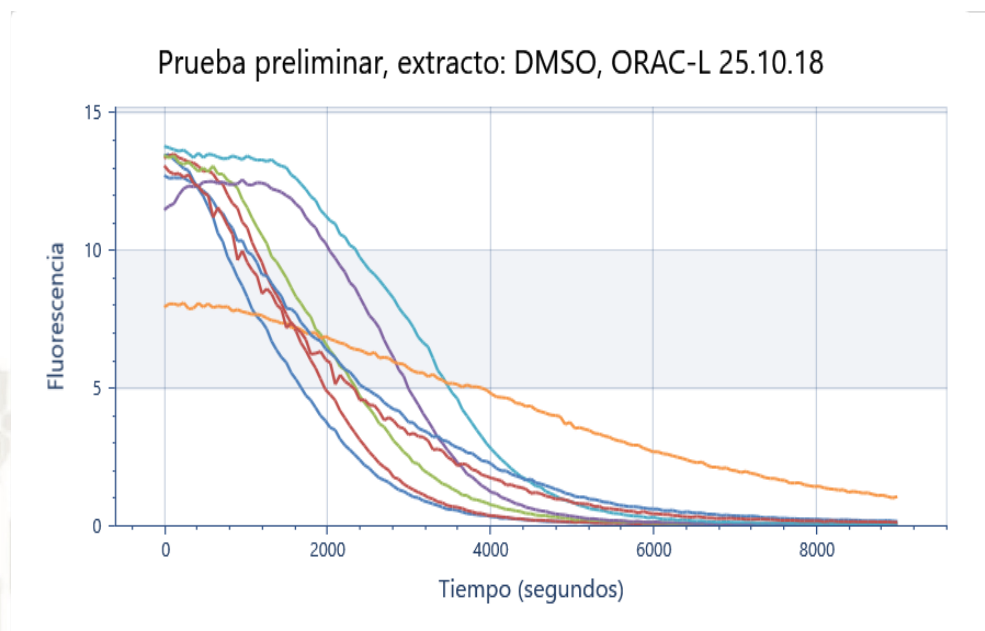


Figura 34: Gráfico del ensayo ORAC-L obtenido de las muestras diluidas 1:3 (línea azul) y 1:5 (línea roja) y de una muestra no diluida (línea naranja) del extracto de la microalga *H. pluvialis* con DMSO.

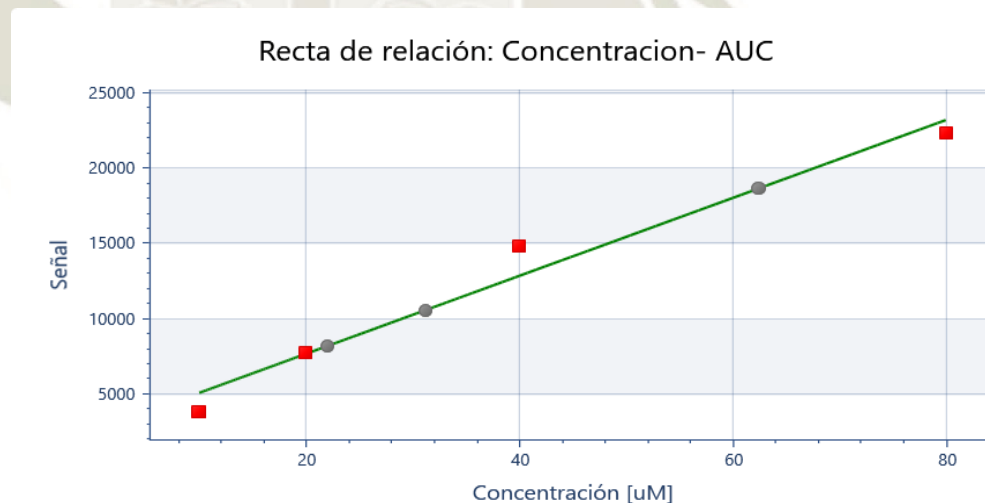


Figura 35: Recta de relación entre las AUC obtenidas y las concentraciones de Trolox empleadas, para la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con muestras de extractos obtenidos con DMSO.

Tabla 5: Resultados obtenidos en la prueba preliminar del ensayo ORAC-L con los extractos obtenidos con DMSO.

	Concentración (μM)	AUC
Trolox	10	5115
	20	7705
	40	12880
	80	23240
Sin diluir	62.49 (eq)	18710
1:3	31.14 (eq)	10590
1:5	21.96 (eq)	8213

Como se puede observar en la Figura 33 las curvas generadas a partir de las muestras procedentes del extracto realizado con DMSO presentan curvas características de una muestra con capacidad antioxidante. Se puede observar que la curva generada por la muestra no diluida (línea naranja) empieza por debajo de las demás curvas esto debido a que posiblemente este haciendo interferencia con la medición de la fluorescencia, sin embargo, las muestras diluidas 1:3 y 1:5 empiezan en puntos cercanos al resto, ubicándose además en la recta de relación obtenida (Figura 34).

3.6 Ensayo ORAC-H y ORAC-L de extractos de microalgas con DMSO.

Luego de hacer las pruebas preliminares para el ensayo ORAC-L se procedió a hacer extractos con DMSO de la microalga *H. pluvialis* y de las microalgas obtenidas en los fotobiorreactores, procedimiento descrito en el punto 2.4.3.2.3, a continuación, los resultados obtenidos:

-ORAC-L de extracto con DMSO de la microalga *H. pluvialis* estresada.

Tabla 6: Resultados obtenidos (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 del extracto obtenido con DMSO de la microalga *H. pluvialis*. DS: Desviación estándar y CV: coeficiente de variación.

Ensayo	Eq. Trolox (μM) de muestras diluidas 1:5
6.11.18	43.97
	50.18
7.11.18	47.57
	50.43
9.11.18	48.21
	53.93
12.11.18	50.36
14.11.18	42.95
DS	3.6203
CV	7.4722
Promedio	48.4500
Varianza	13.1063

-ORAC-L de extracto con DMSO de las microalgas obtenidas después del funcionamiento de los fotobiorreactores (Tabla 7).

-ORAC-H de extractos con DMSO de la microalga *H. pluvialis* y de las microalgas obtenidas después del funcionamiento de los biorreactores (Ver resultados en la Tabla 8).

Con propósito de afirmar la importancia de la inclusión de la β -ciclodextrina en el ensayo ORAC, se hizo un ensayo ORAC-H a ambos extractos obtenidos, comparando luego los resultados obtenidos.

Tabla 7: Resultados obtenidos del ensayo ORAC-L (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 del extracto obtenido con DMSO de microalgas obtenidas en fotobiorreactores (microalgas verdes).

Ensayo	Eq. Trolox (μM) de muestras diluida 1:5
19.11.18	23.51
	25.62
	20.88
20.11.18	30.46
	22.7
	33.23
DS	4.8081
CV	18.4452
Promedio	26.0667
Varianza	23.1173

Tabla 8: Resultados obtenidos para el ensayo ORAC-H (equivalentes Trolox) de muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis* (extracto 1) y de microalgas de los fotobiorreactores (extracto 2).

Ensayo	Eq. Trolox Extracto 1	Eq. Trolox Extracto 2
21.11.18	16.85	1.631
	15.80	< Mín.
	12.16	< Mín.

El resto de los gráficos y rectas obtenidas para cada ensayo mencionado en este capítulo se encuentra en el Anexo 1.

- Resultados finales de los ensayos: Una vez obtenidos los resultados previamente mostrados, se hizo el cálculo de equivalentes Trolox por cada mililitro de extracto (teniendo en cuenta que cada extracto provenía de 20 mg de microalga), resultados mostrados en la Tabla 9.

Tabla 9: Resultados en equivalentes Trolox por cada mililitro de extracto, la sección roja corresponde al extracto obtenido con células de *H. pluvialis* (ORAC-L), la sección verde al extracto obtenido con microalgas (ORAC-L) y la sección azul al ORAC-H.

Ensayo	eq. μM Trolox/mL
6.11.18	8794
	10036
7.11.18	9514
	10086
9.11.18	9642
	10786
12.11.18	10072
14.11.18	8590
19.11.18	4702
	5124
	4176
20.11.18	6092
	4540
	6646
21.11.18	3370
	3160
	2432

Se puede observar que la sección roja presenta resultados que llegan casi a duplicar los valores de equivalentes Trolox por mililitro obtenidos en la sección verde, y casi a triplicar la de la sección azul.

3.7 Análisis de datos obtenidos.

Luego de obtenerlos resultados ya mostrados, se procedió a hacer un análisis de varianza (ANOVA) de los datos mostrados en las tablas 6,7 y 8. La prueba ANOVA, nos dará información acerca de si existe o no diferencia significativa entre estos 3 grupos. Para esto se tiene que tener en los tres grupos la misma cantidad de muestras, por lo que se seleccionó por grupo 3 resultados.

Tabla 10: Datos a ser analizados con la prueba ANOVA.

	Tabla 6	Tabla 7	Tabla 8
	50.18	23.51	16.85
	50.43	25.62	15.80
	50.36	22.7	12.16
Media	50.3233	23.9433	14.9367

Tabla 11: Prueba ANOVA, realizada en Microsoft Excel.

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1 (Tabla 6)	3	150.97	50.32333333	0.01663333
Columna 2 (Tabla 7)	3	71.83	23.94333333	2.27243333
Columna 3 (Tabla 8)	3	44.81	14.93666667	6.05803333

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2029.240622	2	1014.620311	364.660892	5.43277E-07	5.14325285
Dentro de los grupos	16.6942	6	2.782366667			
Total	2045.934822	8				

De la Tabla 11, podemos deducir según los resultados obtenidos que existe diferencia estadísticamente significativa (al 95% de confiabilidad), esto al ver que el valor F obtenido es mayor que el valor de la probabilidad (ambos datos resaltados en amarillo). Luego de esto para saber que grupos son los que hacen esta diferencia, para esto hacemos una prueba Tukey. Para realizar esta prueba es necesario primero fijarse en los datos resaltados en verde en la Tabla 11. Luego tenemos que calcular los siguientes datos: la diferencia honestamente significativa (HSD), multiplicador (tabla de los valores críticos para la prueba de Tukey), cuadrado del erro medio (MSe), el n (tamaño de los grupos) y la media de cada grupo (resta de la media de un grupo con la media de grupo con el que se está comparando) (resaltados en rojo).

Tabla 12: Prueba Tukey para datos obtenidos (95 % de confiabilidad).

Tukey	
HSD	4.179615038
Multiplicador (tablas)	4.34
MSe	2.782366667
n	3

	Tabla 6	Tabla 7	Tabla 8
Tabla 6		26.38	35.3866667
Tabla 7			9.00666667
Tabla 8			

**SI HAY DIFERENCIA ENTRE LOS 3
GRUPOS**

De lo obtenido en la Tabla 12 se puede deducir que los 3 grupos (Tablas 6, 7 y 8) son los que generan la diferencia estadística. Esto porque se puede ver que el valor HSD es superado por los valores de las restas de las medias en comparación de grupos.

3.8 Límites de detección.

Se procedió a hacer el cálculo de los límites de detección para cada repetición realizada, con las cuales se obtuvieron los datos mostrados anteriormente. El cálculo del límite de detección se hizo de la siguiente forma:

Para hallar el límite de detección (L.O.D) se siguió el planteamiento descrito en el libro: “*Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*” (Sexta edición) (Capítulo 5)(97). Donde se muestra que el L.O.D se halla a partir de la siguiente formula:

$$\text{Límite de detección} = y_B + 3S_B$$

Formula que, al ser desarrollada completamente, se convierte en la siguiente expresión:

L. O. D.

$$= \frac{\left[\bar{y} - \left[\left(\frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right) \bar{x} \right] + 3 \left(\sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \right) \right] - \left[\bar{y} - \left[\left(\frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right) \bar{x} \right] \right]}{\left[\frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]}$$

(Elaboración propia, a partir de las fórmulas descritas en el libro. Expresiones para ser reemplazadas por los valores obtenidos en la Tabla 13) (97)

La expresión y_B es el valor “a” de la ecuación de la recta, el cual es calculado utilizando la siguiente formula:

$$\bar{y} - [(b)\bar{x}]$$

Donde “b” es calculado de la siguiente forma:

$$\left(\frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right)$$

Quedando la expresión y_B de la siguiente manera:

$$\bar{y} - \left[\left(\frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right) \bar{x} \right]$$

Las expresiones “a” y “b” son de la ecuación de la recta, representada también como: $y = a + bx$

La expresión S_B según lo descrito en el libro es la expresión $S_{y/x}$, la cual es igual a:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Entonces a la formula $y_B + 3S_B$ se le reemplaza adecuadamente con los términos ya desarrollados. El resultado obtenido es un valor “y” de una ecuación de la recta, el cual tiene que ser reemplazado para hallar el valor “x”, este valor “x” es el valor de límite de detección. En este caso en unidades de μM de Trolox.

Primero se halló el L.O.D de la repetición 6.11.18 siguiendo el siguiente procedimiento:

La repetición 6.11.18 tiene los siguientes datos: en el eje “x” (concentración): 10, 20, 40 y 80; y en el eje “y” (AUC): 6168, 10990, 16130 y 27960.

Tabla 13: Análisis y procesamiento de datos obtenidos en el ensayo 6.11.18 para la obtención del límite de detección. Las expresiones $\bar{x}$ y $\bar{y}$ son los promedios respectivos de cada columna x_i y y_i respectivamente. La expresión $\hat{y}_i$ son los valores “y” pero recalculados con la ecuación de la recta obtenida.

	x_i	y_i	$x_i - \bar{x}$	$(x_i - \bar{x})^2$	$y_i - \bar{y}$	$(y_i - \bar{y})^2$	$(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$	$\hat{y}_i$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$	x_i^2
	10.00	6168	-27.50	756.25	-9144.00	83612736	251460	7022.01739	729345.7047	100.00
	20.00	10990	-17.50	306.25	-4322.00	18679684	75635	10036.5565	909054.4662	400.00
	40.00	16130	2.50	6.25	818.00	669124	2045	16065.6348	4142.88121	1600.00
	80.00	27960	42.50	1806.25	12648.00	159971904	537540	28123.7913	26827.59138	6400.00
Sumas (Σ)	150.00	61248.00	0.00	2875.00	0.00	262933448.00	866680.00	61248.00	1669370.64	8500.00
Promedios	37.50	15312.00								

De esta forma se reemplaza los valores calculados en la formula mostrada en un inicio y se calcula, los valores de “a”, “b” y L.O.D, para este ensayo. Obteniendo los siguientes resultados.

a =301.453913, b= 4007.478261 y L.O.D = 9.092047946 μ M Trolox.

Luego se procedió a hallar los límites de detección de todos los ensayos descritos en el capítulo anterior, para esto se aprovechó la misma hoja de Excel con las fórmulas ya insertadas, a la cual solo se le cambio los datos, obteniendo así la siguiente tabla:

Tabla 14: Límites de detección (μM Trolox) de los ensayos ORAC realizados.

Ensayo	L.O.D
6.11.18	9.09204795
7.11.18	5.92343751
9.11.18	2.15856571
12.11.18	8.31892182
14.11.18	15.355811
19.11.18	12.0383375
20.11.18	6.21939848
21.11.18 (a)	6.48938059
21.11.18 (b)	1.22421839

Como se puede observar los límites de detección entre ensayo y ensayo varían, obteniendo un promedio de $7.42 \mu\text{M}$ Trolox.

Capítulo 4

Conclusiones

Primera. Se diseñó y se construyó 3 fotobiorreactores para el crecimiento y desarrollo de diferentes cepas de microalgas. Asimismo, se pudo lograr obtener curvas de crecimiento donde se puede ver el desarrollo de la cepa con las que se trabajó.

Segunda. Se logró purificar la cepa de *Haematococcus pluvialis*, si bien es cierto existió dificultad para la purificación de esta cepa para su posterior cultivo en los fotobiorreactores, se pudo trabajar, aislar y estresar en medios sólidos de medio BG-11, obteniendo al cabo de 2 semanas cepas estresadas, con las cuales se continuó con el trabajo. Así mismo se logró obtener 3 extractos con diferentes solventes (acetato de etilo-etanol, acetona y DMSO), siendo el extracto con DMSO, el que presentó mayor capacidad antioxidante.

Tercera. Se pudo hacer pruebas preliminares donde se comparó el funcionamiento de los equipos: Realplex2 y Varioskan LUX, para realizar el ensayo ORAC. Observándose que el primer equipo mencionado presenta ciertas limitaciones, lo que lo impide obtener resultados adecuados. Por el contrario, el Varioskan LUX muestra resultados óptimos con los cuales se pudo continuar la presente investigación. Se pudo reproducir el ensayo ORAC-H y ORAC-L, obteniendo resultados satisfactorios en estas pruebas. El BHA presentó capacidad antioxidante el cual pudo mostrarse utilizando el ensayo ORAC-L. La introducción de la molécula de RMCD al ensayo para la solubilización de antioxidantes lipofílicos jugó un rol importante en esta investigación, ya que permitió no solo reproducir en ensayo ORAC-L si no también poder determinar la capacidad antioxidante de extractos de microalgas.

Cuarta. Se logró evaluar la capacidad antioxidante de los extractos de la microalga *H. pluvialis* con acetato de etilo-etanol y acetona, los cuales no presentaron ninguna capacidad antioxidante. Por otro lado, los extractos de la microalga *H. pluvialis* con DMSO muestra capacidad antioxidante con un promedio de 9690 equivalentes Trolox (μM) por cada mililitro de extracto, por otro lado, los extractos de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores también muestran capacidad antioxidante, pero inferior al valor anteriormente mencionado, con un promedio de

5213.33 equivalentes Trolox (μM) por cada mililitro de extracto. Los mismos extractos al ser evaluados con el ensayo ORAC-H muestran una capacidad antioxidante reducida (2987.33 equivalentes Trolox (μM) por cada mililitro de extracto), esto debido quizá a que ambos extractos tienen una presencia importante de antioxidantes lipofílicos los cuales no interactúan adecuadamente con el medio acuoso del ensayo ORAC-H.



Capítulo 5

Recomendaciones

Primera. Se recomienda continuar con los trabajos de aislamiento de la cepa de la microalga *Haematococcus pluvialis*, por lo observado durante este trabajo de investigación no hay lugar en la ciudad de Arequipa donde se pueda encontrar una cepa totalmente pura y asilada de esta microalga.

Segunda. Se recomienda continuar con el trabajo del ensayo ORAC, para esto se aconseja lo siguiente:

- Estandarizar la técnica ORAC-H.
- Adquirir los dispensadores del equipo Varioskan LUX, esto podría no solo agilizar el trabajo, sino también suprimir el error humano al pipetear.
- Adquirir reservorios para el uso de la micropipeta multicanal.
- Adquirir placas de pocillos con bordes oscuros para evitar el contacto con la luz externa de las muestras.

Referencias Bibliográficas.

1. Shah MMR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. *Front Plant Sci* [Internet]. 2016;7:531. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200009>
2. Amitava Dasgupta, Klein K. Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements [Internet]. First Edit. San Diego: Elsevier Inc.; 2014. 344 p. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780124058729/antioxidants-in-food-vitamins-and-supplements#book-description>
3. Rodrigo R. Oxidative stress and antioxidants : their role in human disease. Rodrigo R, editor. New York: Nova Science Publishers, Inc; 2009. 358 p.
4. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160(1):1–40.
5. Kohen R, Nyska A. Toxicologic Pathology. *Toxicol Pathol*. 2002;30(6):620–50.
6. Joaquin Toro RR. Oxidative Stress: Basic Overview. In: Ramon, editor. Oxidative stress and antioxidants : their role in human disease. Nova Scien. New York; 2009. p. 1–24.
7. WEBSTER NR, NUNN JF. Molecular Structure of Free Radicals and Their Importance in Biological Reactions. *Br J Anaesth* [Internet]. 1988;60(1):98–108. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0007091217389092>
8. Mantle D, Preedy VR. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. *Adverse Drug React Toxicol Rev* [Internet]. 1999 Nov;18(4):235–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10687026>
9. Casafranca SA. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA EN AREQUIPA 2016 - 2017 [Internet]. Universidad Nacional de San Agustín; 2018. Available from: <http://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/208570>
10. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* [Internet]. 2008 Jun;4(2):89–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675073>
11. World Health Organization. A global brief on Hypertension - World Health Day 2013. World Heal Organ. 2013;1–40.
12. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation*. 2007;115(10):1285–95.
13. Paolisso G, Giugliano D. Oxidative stress and insulin action: Is there a relationship? *Diabetologia*. 1996;39(3):357–63.

14. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: An endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 1989;161(5):1200–4. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378\(89\)90665-0](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9378(89)90665-0)
15. Izzotti A, Bagnis A, Saccà SC. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2006;612(2):105–14.
16. Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress. *Endocrine*. 2006;29(1):27–32.
17. Rodrigo R, Rivera G. Renal damage mediated by oxidative stress: a hypothesis of protective effects of red wine. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2002 Aug 1;33(3):409–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126763>
18. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. *Arch Toxicol*. 2012;86(3):345–91.
19. Stocker R, Glazer AN, Ames BN. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin (reactive oxygen species/plasma antioxidants/biliverdin/evolution). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84(August):5918–22.
20. Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001;176–86.
21. Balasubramanian MP. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. 2007;39–44.
22. Hu C, Lin J, Lu F, Chou F, Yang D. Determination of carotenoids in *Dunaliella salina* cultivated in Taiwan and antioxidant capacity of the algal carotenoid extract. 2008;109:439–46.
23. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem*. 2005;53(6):1841–56.
24. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(3):303–11.
25. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 1996;16:33–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8839918>
26. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E: Application of the Principles of Physical Organic Chemistry to the Exploration of Its Structure and Function. *Acc Chem Res*. 1986;19(7):194–201.
27. Pfitzner I, Francz PI, Biesalski HK. Carotenoid:methyl- β -cyclodextrin formulations: An improved method for supplementation of cultured cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2000;1474(2):163–8.
28. Szente L, Mikuni K, Hashimoto H, Szejtli J. Stabilization and solubilization of lipophilic natural colorants with cyclodextrins. *J Incl Phenom Mol Recognit Chem*. 1998;32(1):81–9.

29. Butler JM. PCR Amplification. In: Advanced Topics in Forensic DNA Typing [Internet]. Elsevier; 2012. p. 69–97. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374513200004X>
30. Scientific T. Varioskan® LUX User Manual. Thermo Fis. Thermo Fisher Scientific Inc. All; 2015. 54 p.
31. Yang Y, Kim B, Lee J. Astaxanthin structure, metabolism, and health benefits. J Hum Nutr Food Sci [Internet]. 2013;1(1003):1–11. Available from: <http://www.j-scimedcentral.com/Nutrition/Articles/nutrition-1-1003.pdf>
32. Al-bulishi, Moosa MS, Changhu X, Tang Q. Health Aspects of Astaxanthin: A Review. 2015;3(2):71–8.
33. Borowitzka MA. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. J Appl Phycol. 2013;25(3):743–56.
34. Pérez-López P, González-García S, Jeffries C, Agathos SN, McHugh E, Walsh D, et al. Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: From lab to pilot scale. J Clean Prod [Internet]. 2014;64:332–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.07.011>
35. Koller M, Muhr A, Braunegg G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. Algal Res [Internet]. 2014;6(PA):52–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>
36. Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Biotechnol Adv [Internet]. 2011;29(6):568–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.001>
37. Yuan JP, Peng J, Yin K, Wang JH. Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. Mol Nutr Food Res. 2011;55(1):150–65.
38. Saha SK, McHugh E, Hayes J, Moane S, Walsh D, Murray P. Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. Bioresour Technol [Internet]. 2013;128:118–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.049>
39. Park JC, Choi SP, Hong ME, Sim SJ. Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. Bioprocess Biosyst Eng. 2014;37(10):2039–47.
40. Yoo JJ, Choi SP, Kim BW, Sim SJ. Optimal design of scalable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. Bioprocess Biosyst Eng. 2012;35(1–2):309–15.
41. Hata N, Ogbonna JC, Hasegawa Y, Taroda H, Tanaka H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. J Appl Phycol. 2001;13(5):395–402.

42. Kobayashi M, Kakizono T, Nagai S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(3):867–73.
43. Boussiba S, Bing W, Yuan JP, Zarka A, Chen F. Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett*. 1999;21(7):601–4.
44. Chekanov K, Lobakova E, Selyakh I, Semenova L, Sidorov R, Solovchenko A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). *Mar Drugs*. 2014;12(8):4504–20.
45. Yu X, Chen L, Zhang W. Chemicals to enhance microalgal growth and accumulation of high-value bioproducts. *Front Microbiol*. 2015;6(FEB):1–10.
46. Jaime L, Rodríguez-Meizoso I, Cifuentes A, Santoyo S, Suarez S, Ibáñez E, et al. Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from *Haematococcus pluvialis* microalgae. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(1):105–12.
47. Zou T Bin, Jia Q, Li HW, Wang CX, Wu HF. Response surface methodology for ultrasound-assisted extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Mar Drugs*. 2013;11(5):1644–55.
48. Wang L, Yang B, Yan B, Yao X. Supercritical fluid extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its antioxidant potential in sunflower oil. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2012;13(JANUARY):120–7.
49. Hagen C, Siegmund S, Braune W. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur J Phycol*. 2002;37(2):217–26.
50. Wayama M, Ota S, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One*. 2013;8(1):1–9.
51. Santos M., Mesquita J. Ultrastructural study of *Haematococcus* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia* (Tokyo). 1984;49:215–28.
52. Boussiba S, Vonshak A. Astaxanthin accumulation in the green alga *haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol*. 1991;32(7):1077–82.
53. Eisenreich W, Rohdich F, Bacher A, Eisenreich W. Deoxyxylulose-phosphate-pathway-to-terpenoids_2001_Trends-in-Plant-Science. 2001;6(2):78–84.
54. Cunningham FX, Gantt E. Genes and Enzymes of Carotenoid Biosynthesis in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [Internet]. 1998;49(1):557–83. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.49.1.557>
55. Gwak Y, Hwang YS, Wang B, Kim M, Jeong J, Lee CG, et al. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. *J Exp Bot*. 2014;65(15):4317–34.

56. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar GA. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. *J Exp Bot*. 2008;59(6):1409–18.
57. Steinbrenner J. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiol* [Internet]. 2001;125(2):810–7. Available from: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.125.2.810>
58. Lotan T, Hirschberg J. <Beta-C-4-Oxygenase Cloning.Pdf>. 1995;364:1–4.
59. Solovchenko AE. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynth Res*. 2015;125(3):437–49.
60. Kang CD, Lee JS, Park TH, Sim SJ. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68(2):237–41.
61. Su Y, Wang J, Shi M, Niu X, Yu X, Gao L, et al. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014;170:522–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.018>
62. Stanier RY. Generic Assignments , Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. 2018;110(2):1–61.
63. Fabregas J. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis* Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. 2000;(May 2014).
64. Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar GA. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. 2002;517–21.
65. Sarada R, Tripathi U, Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. 2002;37:623–7.
66. Kobayashi M, Hirai N, Kurimura Y, Ohigashi H, Tsuji Y. Absciscic acid-dependent algal morphogenesis in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. 1997;79–85.
67. Tjahjono AE, Hayama Y, Kakizono T, Terada Y, Nishio N, Nagai S. Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol Lett* [Internet]. 1994 Feb;16(2):133–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF01021659>
68. Wan M, Zhang J, Hou D, Fan J, Li Y, Huang J, et al. Bioresource Technology The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light – dark cyclic cultivation. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014;167:276–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.030>

69. Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. Bioresource Technology Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014;158:329–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.044>
70. Dom AR. Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* q. 2004;92:209–14.
71. Sun H, Kong Q, Geng Z, Duan L, Yang M, Guan B. Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* [Internet]. 2015 Jun;186:67–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802050>
72. Kaewpintong K, Shotipruk A, Powtongsook S, Pavasant P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresour Technol*. 2007;98(2):288–95.
73. Ranjbar R, Inoue R, Shiraishi H, Katsuda T, Katoh S. High efficiency production of astaxanthin by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis* in a bubble column photobioreactor. 2008;39:575–80.
74. Issarapayup K, Powtongsook S, Pavasant P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. *J Biotechnol* [Internet]. 2009;142(3–4):227–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.04.014>
75. Zhang BY, Geng YH, Li ZK, Hu HJ, Li YG. Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. *Aquaculture* [Internet]. 2009;295(3–4):275–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.06.043>
76. Wang J, Han D, Sommerfeld MR, Lu C, Hu Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photobioreactor. *J Appl Phycol*. 2013;25(1):253–60.
77. Methods A. Forum : Oxidative Stress Status IN VIVO TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY : COMPARISON OF DIFFERENT. 1999;27(99):1173–81.
78. Rock L, Brunswick N. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. 2005;4290–302.
79. Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem*. 2002;50(16):4437–44.
80. Gillespie KM, Chae JM, Ainsworth EA. Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants. *Nat Protoc*. 2007;2(4):867–70.
81. Laboratories B. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated β -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. 2002;
82. Garc M. The Role of Cyclodextrins in ORAC-Fluorescence Assays. Antioxidant Capacity of Tyrosol and Ca ff eic Acid with Hydroxypropyl- β - Cyclodextrin. 2013;

83. Acchiocca MARAB, Oward LUKEH, Oodill MAHA, Uang DEH, Oxin BOU, Acob ROJ. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. 2003;0–6.
84. Chen C, Yeh K, Aisyah R, Lee D, Chang J. Bioresource Technology Cultivation , photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production : A critical review. Bioresour Technol [Internet]. 2011;102(1):71–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
85. R. Y. STANIER, R. KUNISAWA, M. MANDEL GC-B. Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). BACTEROLOGICAL Rev. 1971;35(2):171–205.
86. Šoštariè M, Golob J, Bricelj M, Klinar D, Pivec A. Studies on the growth of *Chlorella vulgaris* in culture media with different carbon sources. Chem Biochem Eng. 2009;23(4):471–7.
87. Arredondo B; VD. Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación la biomasa microalgal. 2007;(January 2007):17–27.
88. Dong S, Huang Y, Zhang R, Wang S, Liu Y. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. ScientificWorldJournal [Internet]. 2014;2014:694305. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3916103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
89. Kim DY, Vijayan D, Praveenkumar R, Han JI, Lee K, Park JY, et al. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. Bioresour Technol [Internet]. 2016;199:300–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
90. Ruen-ngam D, Shotipruk A, Pavasant P. Comparison of extraction methods for recovery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Sep Sci Technol. 2011;46(1):64–70.
91. Régnier P, Bastias J, Rodriguez-ruiz V, Caballero-casero N, Letourneur D, Gueguen V, et al. Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. 2015;2857–74.
92. Zuo Z, Qin F, Zhang Y, Liu Y, Sun J. Investigation on Electroporation: Mediated Transformation of *Chlorella ellipsoidea*. In 2014. p. 277–84. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-37916-1_28
93. Handbook of Marine Microalgae [Internet]. Elsevier; 2015. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130191179>
94. Wang H, Cao G, Prior RL. Total Antioxidant Capacity of Fruits. J Agric Food Chem [Internet]. 1996 Jan;44(3):701–5. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf950579y>

95. Frankel EN, Frankel EN. Antioxidants. Lipid Oxid [Internet]. 2012 Jan 1 [cited 2018 Dec 18];209–58. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780953194988500102>
96. WATANABE J, OKI T, TAKEBAYASHI J, YAMASAKI K, TAKANO-ISHIKAWA Y, HINO A, et al. Improvement of the Lipophilic-Oxygen Radical Absorbance Capacity (L-ORAC) Method and Single-Laboratory Validation. Biosci Biotechnol Biochem [Internet]. 2013 Apr 23;77(4):857–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.120786>
97. Miller, James N. JCM. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Sixth Edit. Limited PE, editor. Harlow; 2010. 297 p.



Anexos

Anexo 1

Rectas de relación entre las AUC obtenidas y la concentración de estándares y muestras, de los diferentes ensayos realizados.

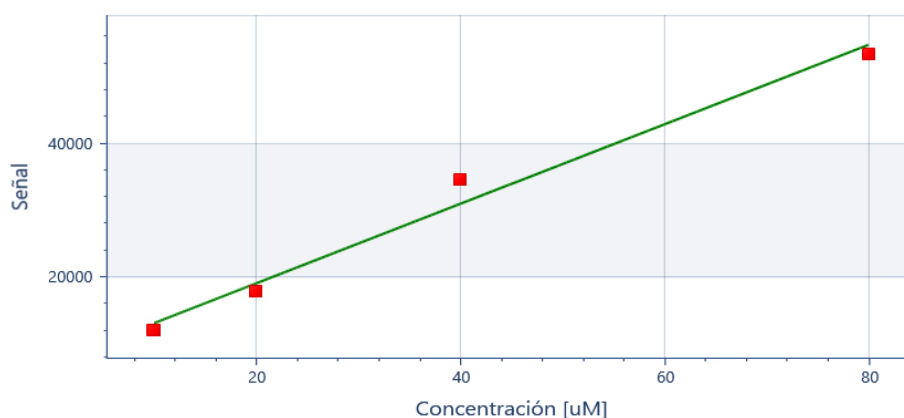


Figura 36: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 29.08.18.

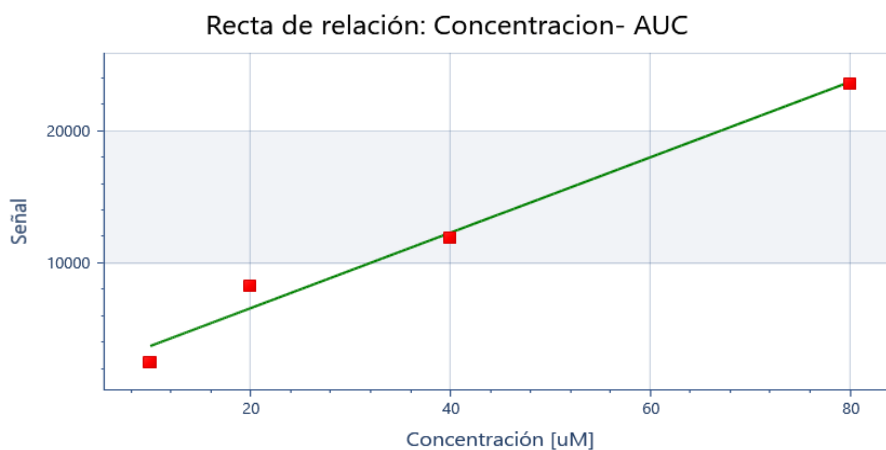


Figura 37: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 15.10.18.

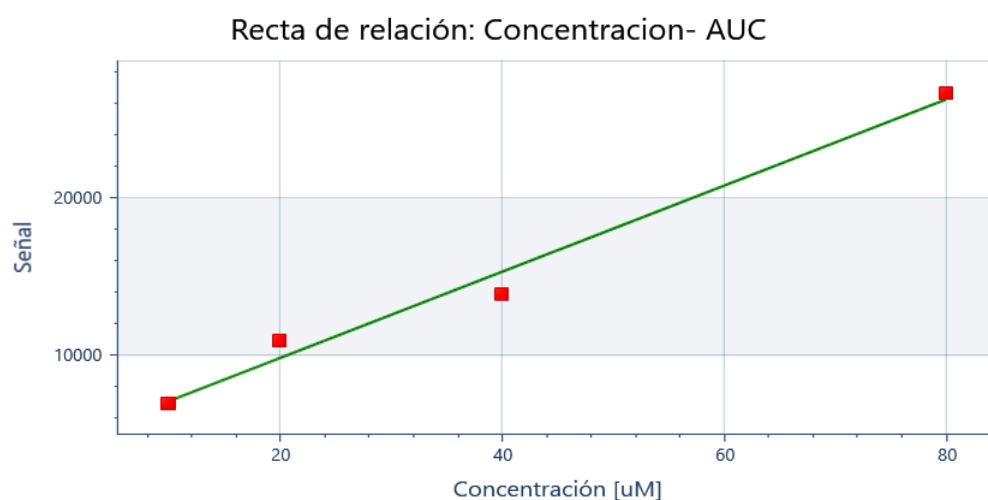


Figura 38: Recta de relación de entre AUC y concentración de estándares de Trolox, ensayo ORAC 23.10.18.

Extracto: DMSO, ORAC-L 06.11.18

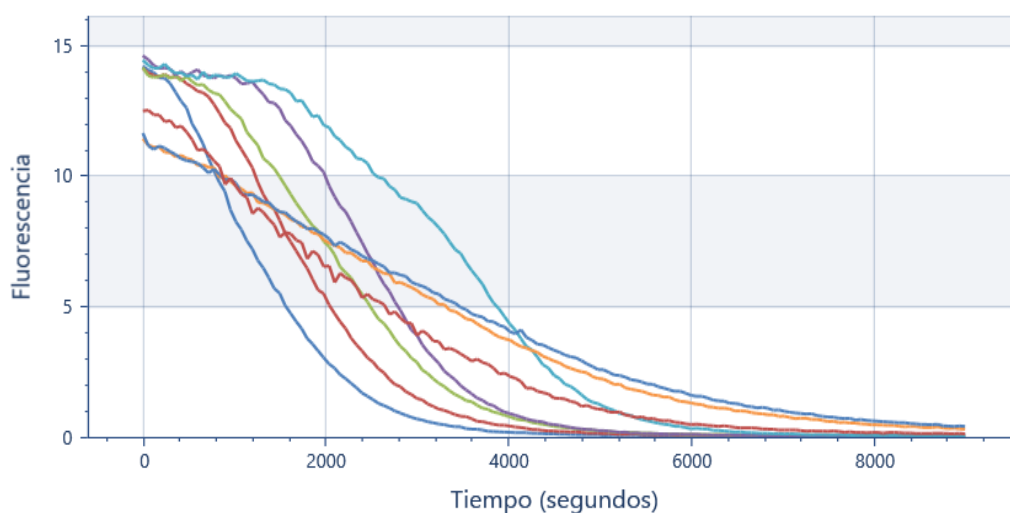


Figura 39: Gráfico del ensayo ORAC-L 06.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentraci3n- AUC

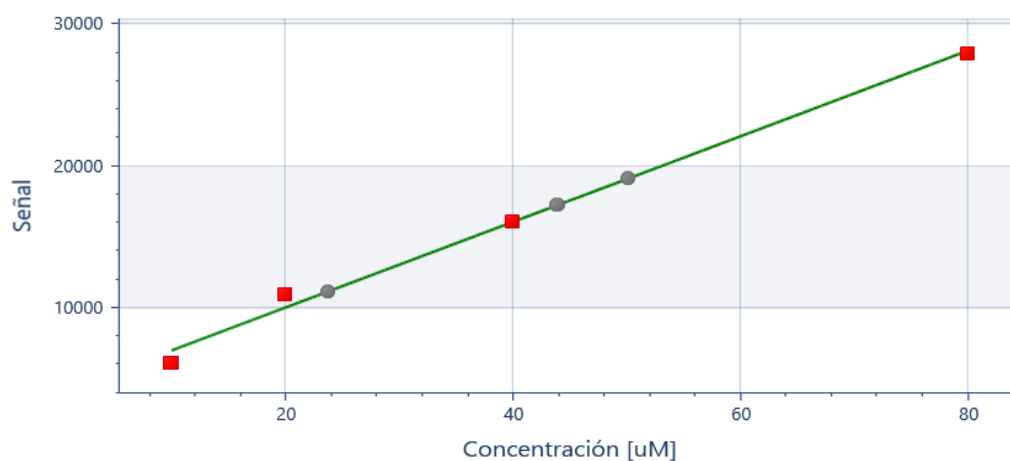


Figura 40: Recta de relaci3n entre AUC y concentraci3n de Trolox del ensayo ORAC-L 06.11.18, puntos rojos: est3ndares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 07.11.18

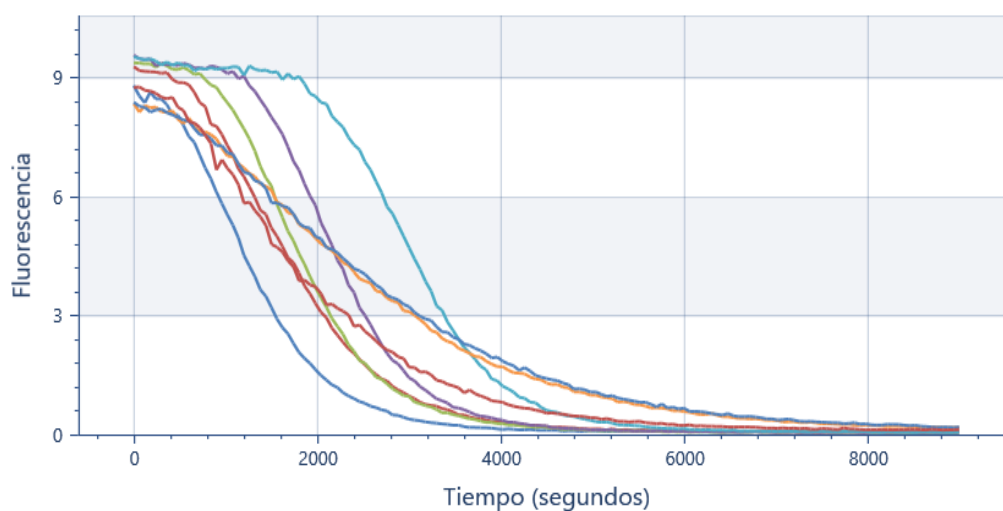


Figura 41: Gráfico del ensayo ORAC-L 07.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentraci- AUC

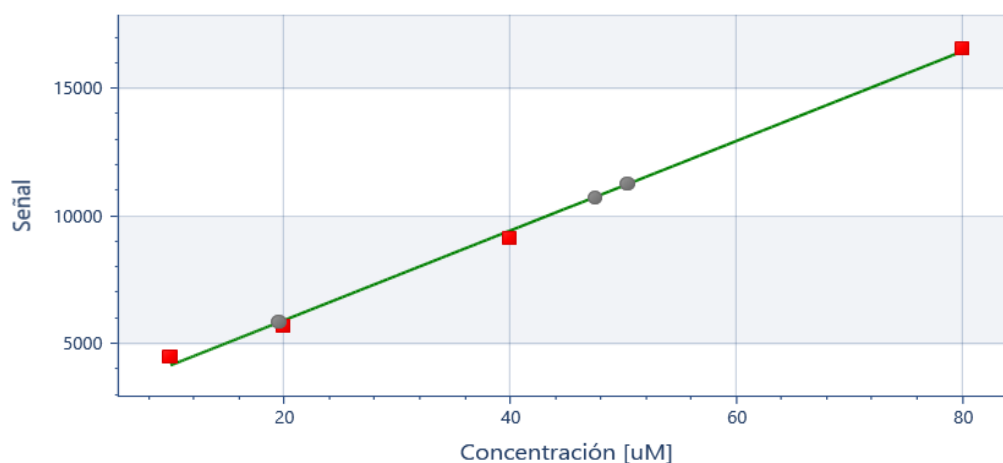


Figura 42: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 07.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 09.11.18

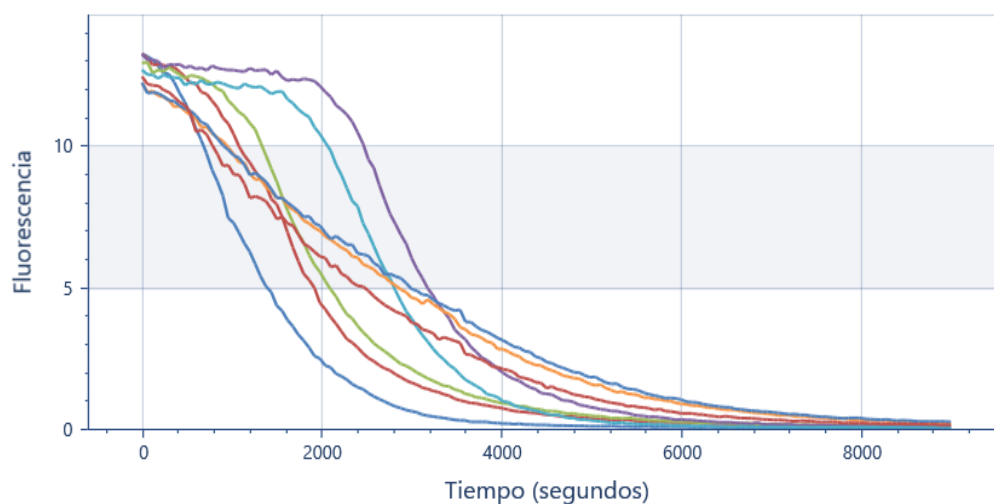


Figura 43: Gráfico del ensayo ORAC-L 09.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentracion- AUC

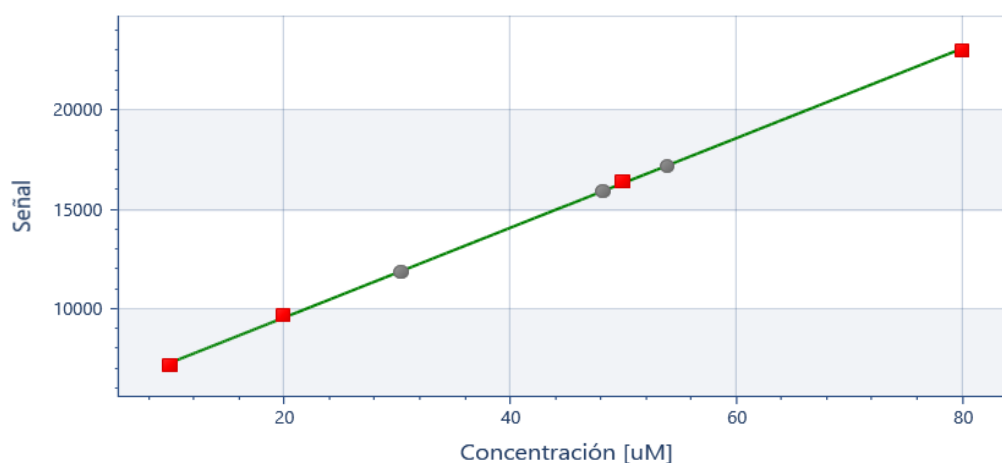


Figura 44: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 09.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 12.11.18

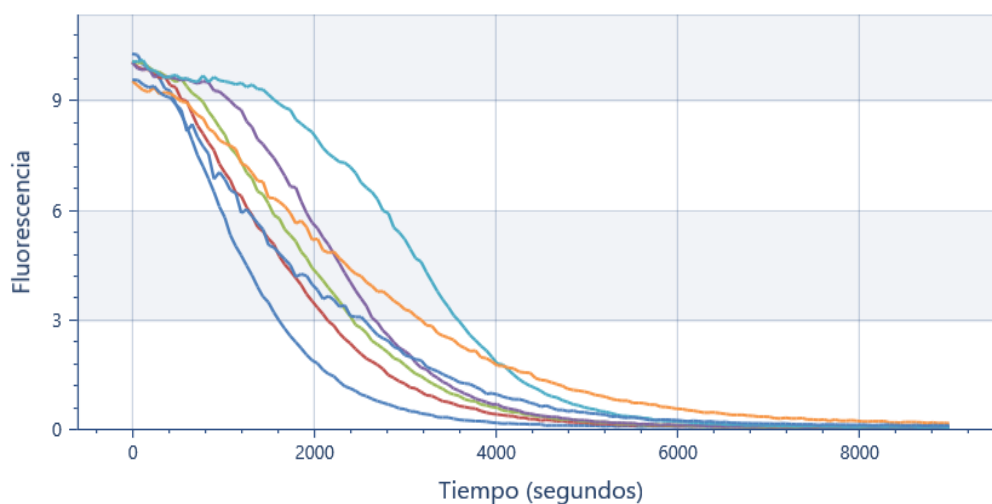


Figura 45: Gráfico del ensayo ORAC-L 12.11.18 donde se trabajó con una muestra diluida 1:5 y 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentración- AUC

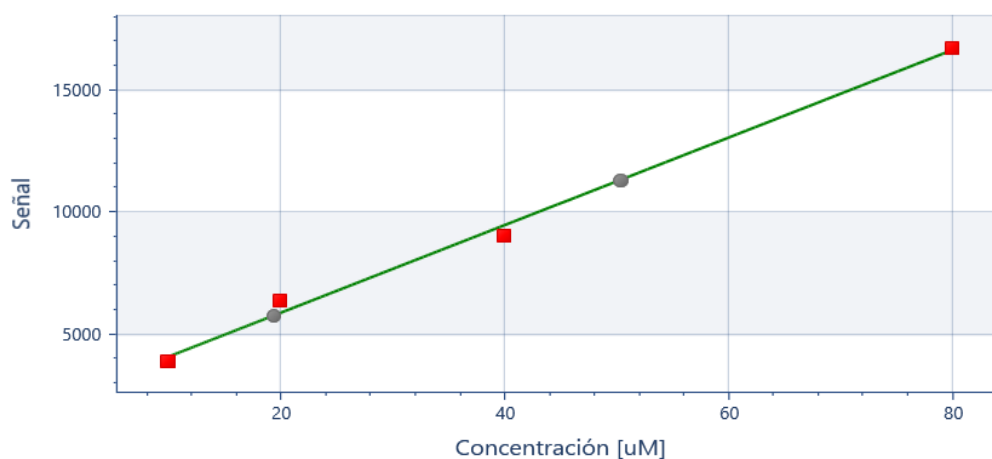


Figura 46: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 12.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 13.11.18

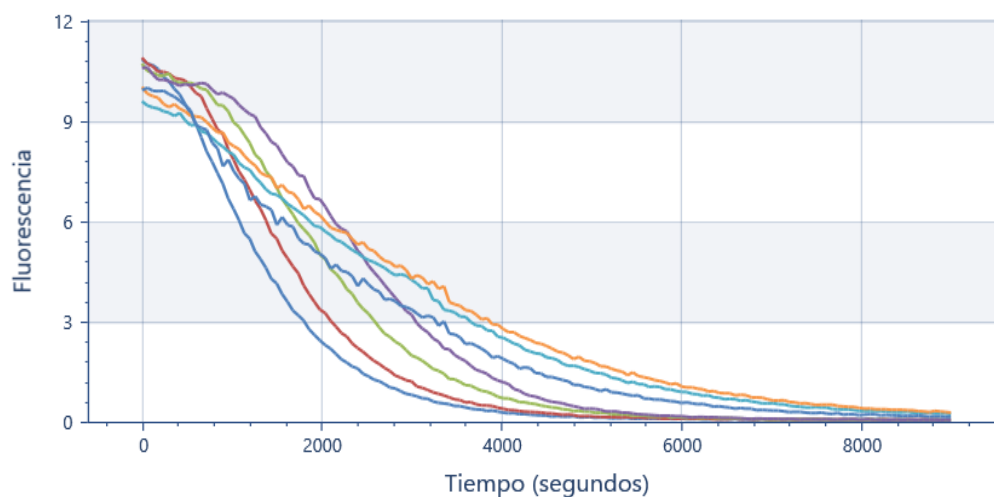


Figura 47: Gráfico del ensayo ORAC-L 13.11.18 donde se trabajó con dos muestras diluidas 1:5 y una 1:7 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentración- AUC

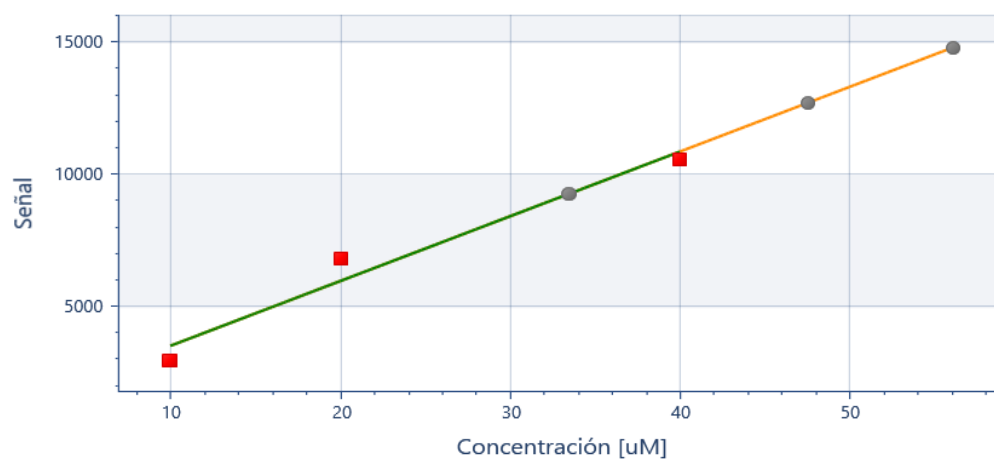


Figura 48: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 13.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 14.11.18

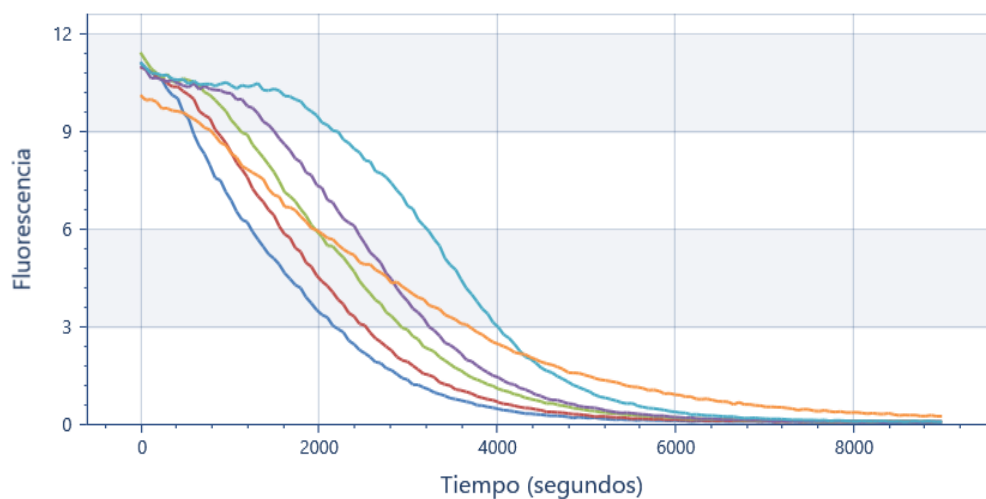


Figura 49: Gráfico del ensayo ORAC-L 14.11.18 donde se trabajó con una muestra diluida 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentración- AUC

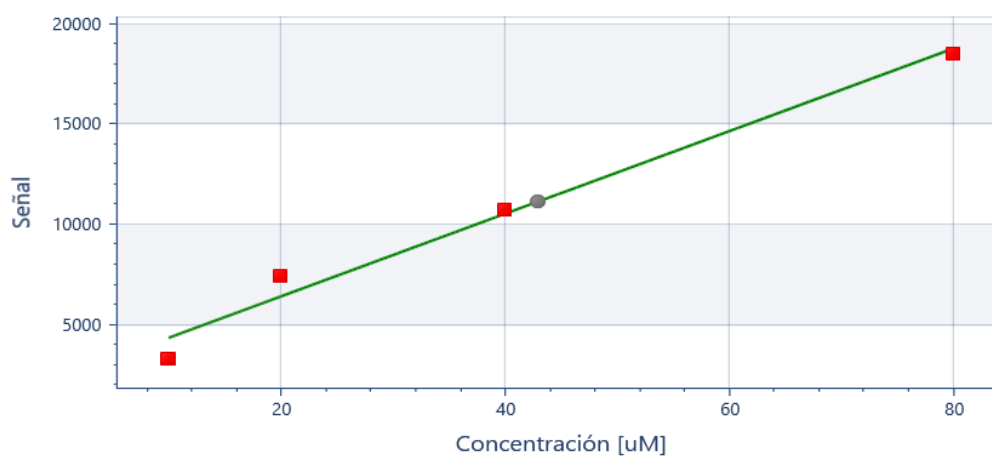


Figura 50: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 14.11.18, puntos rojos: estándares, punto gris: muestra.

Extracto: DMSO, ORAC-L 19.11.18

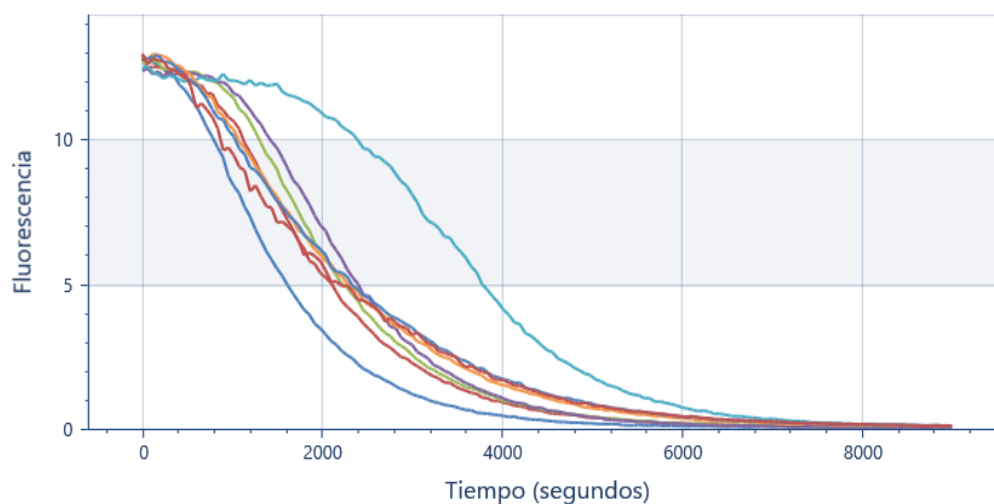


Figura 51: Gráfico del ensayo ORAC-L 19.11.18 donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.

Recta de relación: Concentracion- AUC

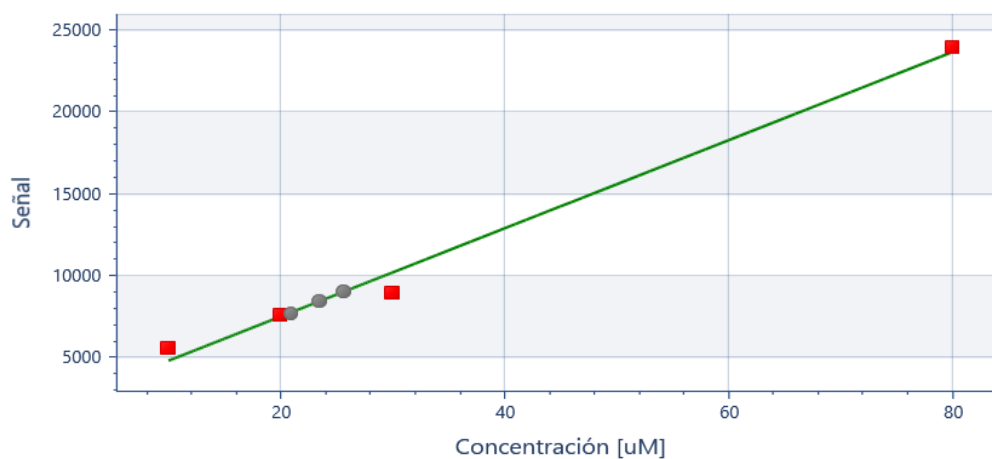


Figura 52: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 19.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-L 20.11.18

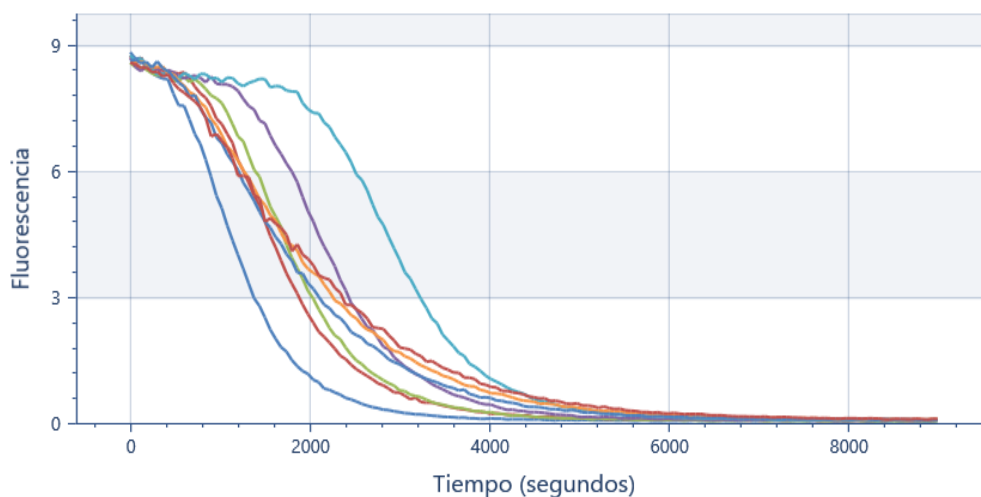


Figura 53: Gráfico del ensayo ORAC-L 20.11.18 donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.

Recta de relación: Concentraci- AUC

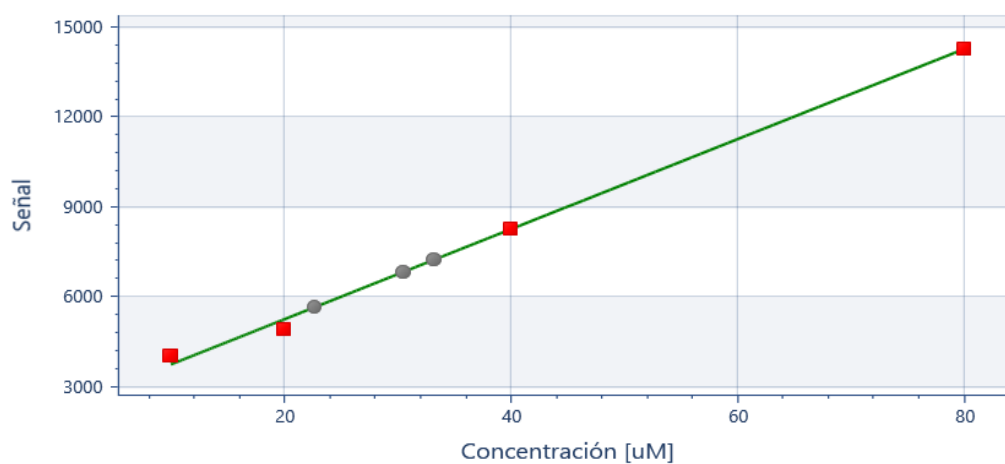


Figura 54: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-L 20.11.18, puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-H 21.11.18 (a)

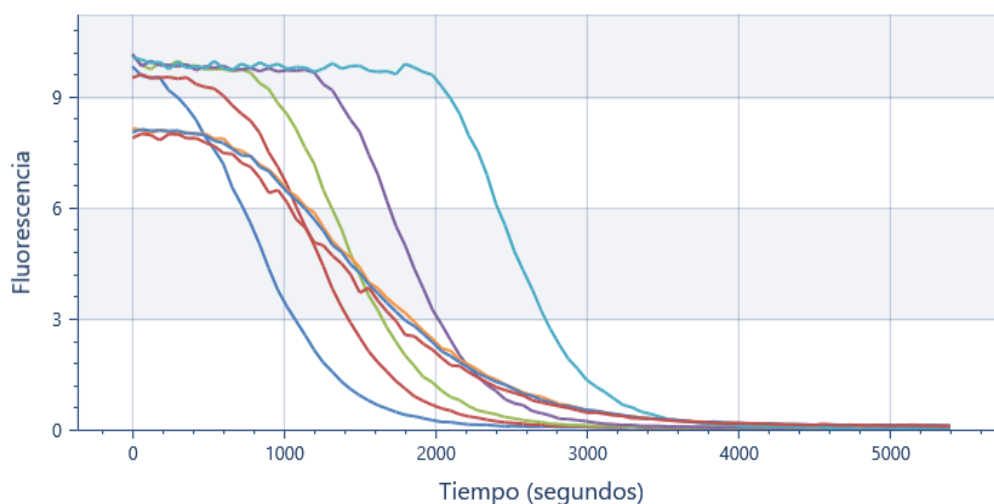


Figura 55: Gráfico del ensayo ORAC-H 21.11.18 (a) donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de la microalga *H. pluvialis*.

Recta de relación: Concentraci- AUC

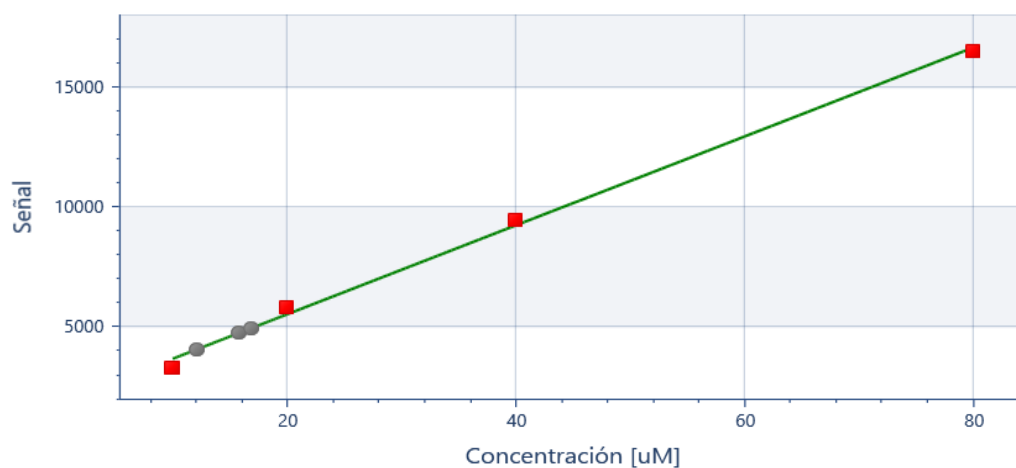


Figura 56: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-H 21.11.18 (a), puntos rojos: estándares, puntos grises: muestras.

Extracto: DMSO, ORAC-H 21.11.18 (b)

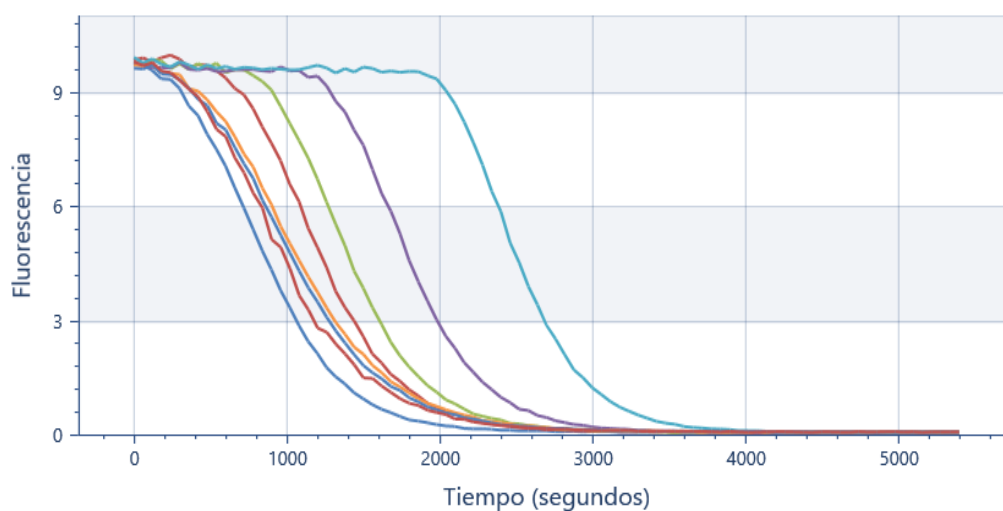


Figura 57: Gráfico del ensayo ORAC-H 21.11.18 (b) donde se trabajó con muestras diluidas 1:5 de los extractos obtenidos con DMSO de las microalgas obtenidas luego del funcionamiento de los biorreactores.

Recta de relación: Concentración- AUC

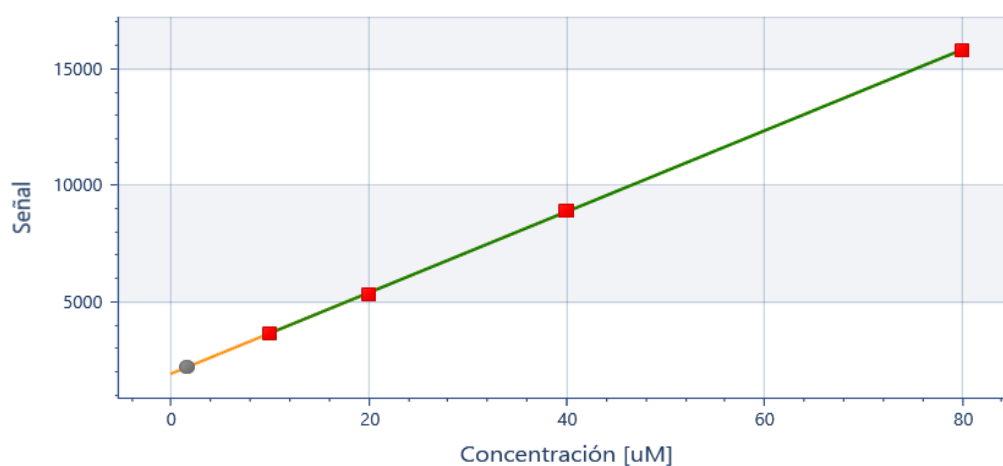


Figura 58: Recta de relación entre AUC y concentración de Trolox del ensayo ORAC-H 21.11.18 (b), puntos rojos: estándares, punto gris: muestra.

Anexo 2

Plano del diseño del fotobiorreactor para el crecimiento de microalgas.



