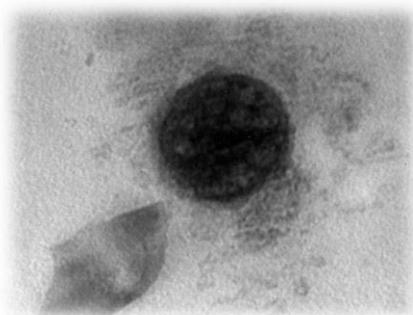




Universidad Nacional del Sur,
Departamento de Bioquímica, Biología y Farmacia



**CULTIVO DE *Haematococcus pluvialis* PARA EL
DESARROLLO DE NANOBIOCOMPUESTOS CON
POTENCIAL INTERÉS INDUSTRIAL**



Alumna: Michelle Morales

Directora: Dra. Paola Scodelaro Bilbao

Co-directora: Dra. Verónica Lassalle

Bahía Blanca



Universidad Nacional del Sur,
Departamento de Bioquímica, Biología y Farmacia



**CULTIVO DE *Haematococcus pluvialis* PARA EL
DESARROLLO DE NANOBIOCOMPUESTOS CON
POTENCIAL INTERÉS INDUSTRIAL**

Tesis de grado presentada como requisito para optar por el
grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas.

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is stylized and appears to be "Michelle Morales".

Alumna: Michelle Dana Morales

A handwritten signature in blue ink on a light blue background. The signature is stylized and appears to be "Paola Scodelaro Bilbao".

Directora: Dra. Paola Scodelaro Bilbao

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Blanca, por siempre estar ahí al pie del cañón, por incentivar me todo el tiempo a estudiar, a nunca bajar los brazos, a superarme y a ser mejor persona. Sin ella no sería quien soy hoy.

A mi papá Sergio, por nunca juzgar mis decisiones, por acompañarme, por transmitirme su sabiduría y su cultura del trabajo.

A mi hermano Alan, también por estar y quererme a su forma.

A mi hermano Fernando, por escucharme, aconsejarme y por estar a pesar de la distancia.

A mi Abuelita Irene, por mimarme cada vez que voy a visitarla a Buenos Aires y por ser tan compinche conmigo.

A mi psicóloga, Caro, por acompañarme estos años de carrera con mis crisis y todas mis frustraciones.

A mis amigxs, la familia que elegí, Katy, Pao, Mily, Cami, Flor, Rodri, que me acompañan desde hace años, por escucharme, aconsejarme y llenar mi vida de alegría.

A mis amigas de la carrera, Anto, Dani, Sofi, Deni, Naza, Mica, Ana, por las horas de estudio, por los mates compartidos y por todo el apoyo psicológico que nos dimos mutuamente.

A mi vecina y amiga Adri, por todas las cervezas compartidas y las horas en la sala de estudio con mucho mate de por medio.

A mi amiga Gise, por quedarse igual, por los recis, la música y todo lo lindo compartido.

A Pao y a Vero mis directoras, por la gran paciencia que me tuvieron estos años, por acompañarme y por no dejarme sola en este camino.

A mi consejera Meli, que siempre estuvo para ayudarme en mis momentos de crisis dándome una palabra de aliento para no rendirme.

A mí, por perseverar tantos años, por nunca rendirme o las veces que me caí, levantarme. Es algo tan gratificante poder cumplir uno de mis sueños y cerrar una etapa tan hermosa y tan difícil para mí.

Y por último quiero agradecer a la Universidad Nacional del Sur, por permitirme estudiar en su establecimiento, por brindarme las herramientas y los contenidos teóricos- prácticos. Estoy súper agradecida de la vida y a mis padres (este logro también es de ellos) por haber tenido el privilegio de estudiar en esta maravillosa universidad pública. Ojalá el día de mañana siga este sistema educativo y que más personas puedan acceder a ello.

Índice

Resumen	4
1. Introducción	5
1.1. Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
1.2. Hipótesis central	7
2. Materiales y métodos	8
2.1. <i>Obtención y mantenimiento de Haematococcus pluvialis</i>	8
2.2. <i>Condiciones experimentales</i>	8
2.3. <i>Determinación de densidad celular</i>	8
2.4. <i>Determinación del peso seco</i>	8
2.5. <i>Análisis morfológico</i>	8
2.6. <i>Determinación de propiedades bioquímicas</i>	8
2.6.1 <i>Contenido de clorofilas y carotenoides</i>	8
2.6.2 <i>Cuantificación de proteínas</i>	9
2.6.3 <i>Determinación de la capacidad antioxidante</i>	9
2.6.4 <i>Determinación de lípidos neutros</i>	9
2.7. <i>Obtención de la dispersión de ZnO NPs en medio de H. pluvialis acuoso</i>	9
2.8. <i>Caracterización química de la dispersión obtenida (ZnO NPs – H. pluvialis)</i>	10
2.8.1 <i>Análisis del tamaño hidrodinámico (DLS)</i>	10
2.8.3 <i>Análisis de la carga superficial (potencial Z)</i>	11
2.9. <i>Caracterización bioquímica de la dispersión obtenida (ZnO NPs – H. pluvialis)</i>	11
2.10 <i>Análisis estadístico</i>	11
3. Resultados	12
3.1. <i>Cultivo de Haematococcus pluvialis y parámetros de crecimiento</i>	12
3.2. <i>Análisis bioquímico de la biomasa</i>	13
3.3. <i>Estudio de la interacción entre nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) y biomasa algal</i>	16
3.4. <i>Propiedades bioquímicas de la dispersión ZnO NPs y biomasa algal</i>	18
4. Discusión	20
5. Conclusiones	24
6. Referencias bibliográficas	25

Resumen

El objetivo principal de la presente tesis de grado fue desarrollar cultivos de *Haematococcus pluvialis*, una microalga aislada de la región de Bahía Blanca, con el propósito de utilizarla como materia prima para el diseño de nanobiocompuestos con propiedades de interés para el sector industrial. *H. pluvialis* se obtuvo de la colección disponible en el Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas del CERZOS y se cultivó bajo condiciones óptimas para su posterior análisis bioquímico. Luego de diez días de cultivo, se observó un notable aumento del contenido de clorofilas, carotenoides, proteínas y lípidos neutros, así como de la capacidad antioxidante de la biomasa obtenida. Posteriormente, esta biomasa se utilizó como medio dispersante de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs). En relación a esto, se ensayaron dos proporciones de ZnO NPs : *H. pluvialis* (2:1) y (1:1) donde se registró una estabilización de las NPs que podría atribuirse a la adsorción de las microalgas en la superficie de las NPs. Asimismo, se analizó la composición bioquímica de la dispersión ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1), revelando una disminución significativa en la concentración de todas las macromoléculas orgánicas. Este estudio reviste una gran importancia resultando crucial comprender las interacciones entre ambos componentes. Podría extrapolarse para evaluar las interacciones entre diversas clases de organismos acuáticos y variedad de nanopartículas, ampliando así el alcance más allá de las algas y las ZnO NPs. Este enfoque contribuirá a establecer una base de datos completa para mitigar la liberación ambiental de nanomateriales. Además, existe un potencial para el desarrollo de nanobiocompuestos con aplicaciones en el mercado industrial, tecnológico o médico

1. Introducción

Las microalgas son organismos microscópicos con capacidad de sintetizar diversas moléculas con propiedades bioactivas y de interés como ingredientes de alimentos, cosméticos, medicamentos y suplementos para la salud. Además, algunas especies se emplean como materia prima para la obtención de polímeros de base biológica o bioplásticos (Alam et al., 2020). Entre estas moléculas se encuentran pigmentos, proteínas, vitaminas, enzimas y gran variedad de ácidos grasos. Estos últimos son intensamente estudiados debido a su potencial como materia prima para generar biocombustibles de una fuente renovable, como también para la suplementación de alimentos con ácidos grasos poliinsaturados. En relación al medioambiente, las microalgas tienen mayor capacidad de fijar dióxido de carbono respecto a las plantas, colaborando en la mitigación del efecto invernadero. Además, pueden aplicarse en biorremediación ambiental debido a su capacidad depuradora de aguas residuales, en donde han demostrado ser eficientes en la reducción de la demanda biológica de oxígeno (DBO) así como también de la demanda química de oxígeno (DQO), y en la disminución de la concentración de nitrógeno, fósforo y algunos metales pesados (Hernández- Pérez & Labbé, 2015)

Haematococcus pluvialis es una microalga oleaginosa ampliamente estudiada, la cual pertenece a la clase Chlorophyceae, orden Volvocales, familia Haematococcaceae (Shah et al., 2016). Esta especie es de interés debido a su capacidad de sintetizar carotenoides como la astaxantina. La misma constituye el producto de mayor valor agregado de esta especie y, por ello, es de relevancia a nivel comercial. Este carotenoide tiene una elevada capacidad antioxidante, superior a la de las vitaminas E y C, y además posee propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipertensiva, antienvjecimiento, lo que permite ampliar su uso en humanos (Rao et al., 2013; Shah et al., 2016; Mularczyk et al., 2020; Ren et al., 2021). La astaxantina se sintetiza y acumula representando un 5% del peso seco del quiste de resistencia de *H. pluvialis*. Además de astaxantina, se ha comprobado que *H. pluvialis* es una fuente de lípidos bioactivos de alto valor nutricional entre los que se encuentran ácidos grasos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) y poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), incluyendo ácidos grasos esenciales (Montero Sánchez, 2012; Li et al., 2019; Ren et al., 2021).

Los quistes de resistencia de *H. pluvialis* se generan cuando es sometida a condiciones ambientales desfavorables tales como deprivación de nutrientes, cambios en la intensidad de luz, temperatura y/o pH. En estas situaciones la microalga pierde la motilidad y adquiere una forma esférica, rodeándose de una gruesa pared celular conformada por polisacáridos complejos (Hernández-Morales et al., 2015, Ren et al., 2021). Su ciclo vital, entonces, presenta polimorfismo celular con formas flageladas, palmeloides, y aplanosporas las cuales variarán en función de las condiciones de cultivo y la disponibilidad de nutrientes. Las fases móviles son de forma ovoide (microzooides y macrozooides) y se movilizan con la ayuda de dos flagelos apicales de igual tamaño. Las células son de color verde y se caracterizan por poseer forma

elipsoidal, un espacio periplasmático ocupado por una matriz gelatinosa cristalina entre el protoplasto y la pared celular delgada, los cuales se conectan a través de delicadas conexiones citoplasmáticas. En contraste, las fases no móviles (palmela y aplanosporas) carecen de flagelos y se convierten en células esféricas de mayor tamaño. Las aplanosporas se caracterizan por poseer paredes gruesas y un color rojo, lo cual da origen a su nombre (Kobayashi et al., 1997; Boussiba, 2000; Kim et al., 2014; Shah et al., 2016; Mularczyk et al., 2020).

Las nanopartículas (NPs) se definen en general como aquellas partículas con un tamaño en la nanoescala menor a 1000 nanómetros. Son un componente clave de la nanociencia y la nanotecnología gracias a su potencial de uso en sectores como la medicina, electricidad, cosmética, informática, biología, entre otras (Pardo et al., 2021). En particular, las nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) se encuentran en diferentes materiales de uso cotidiano como protectores solares, en los cuales cumplen la función de bloquear los rayos UV. También, conforman algunos medicamentos ya que permiten mejorar la selectividad del tratamiento, posibilitando que se localice mejor el sitio de acción dónde se debe liberar el medicamento (Bentacour et al., 2016; Britto-Hurtado et al., 2023). Sin embargo, su aplicación puede presentar desventajas afectando negativamente la salud, ya que se ha reportado que su inhalación en grandes cantidades puede producir toxicidad pulmonar. Por otro lado, el aumento de su biodisponibilidad se ha vinculado con un impacto ambiental negativo. Para mitigar estos efectos negativos, o bien, mejorar las propiedades de las NPs se ha comenzado a evaluar la factibilidad de conjugarlas con extractos de vegetales y/o microalgas (Gutiérrez-González et al., 2013). En este sentido, Chen y colaboradores (2012) fue uno de los precursores al evaluar las interacciones de la microalga *Chlorella sp.* con ZnO NPs con el objetivo de interpretar su comportamiento dentro de una matriz compleja de proteínas, lípidos y otras moléculas. Por otro lado, y en relación con el tema de la presente tesis, Salehi y colaboradores (2019) obtuvieron un biofotocatalizador híbrido eficiente combinando ZnO NPs con *Chlorella vulgaris* y *Dunaliella tertiolecta* para el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, el desarrollo eficiente y la implementación de estas formulaciones se ve obstaculizada debido a la escasa información disponible sobre este tipo de estructuras respecto de sus propiedades y potencialidades. En relación con esto, en el presente estudio se propone emplear cultivos de *H. pluvialis*, una especie aislada de la región de Bahía Blanca, para el diseño de nanobiocompuestos con propiedades específicas para emplearse en diversas áreas de interés regional y nacional.

1.1. Objetivos

Objetivo general

Desarrollar cultivos de *Haematococcus pluvialis*, una microalga aislada de la región de Bahía Blanca, adecuados para emplear como materia prima para el diseño de nanobiocompuestos con propiedades de interés para el sector industrial.

Objetivos específicos

- Desarrollar cultivos *in vitro* de *H. pluvialis* en fase exponencial, analizando la producción de biomasa y sus parámetros de crecimiento.
- Determinar la composición bioquímica de la biomasa resultante, con el fin de evaluar el contenido de biomoléculas de interés.
- Estudiar las interacciones entre nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) y biomasa de *H. pluvialis* como una primera etapa para definir las vías de síntesis de nanobiocompuestos.

1.2. Hipótesis central

Los cultivos de *H. pluvialis* pueden ser utilizados como materia prima para la síntesis de nanobiocompuestos. La combinación de las ZnO NPs con la biomasa microalgal pueden generar un nanobiocompuesto con propiedades mejoradas que podría ser eficiente para aplicaciones en diversas áreas (agro, biomedicina, etc). El conocimiento de las interacciones entre ambos componentes resulta crucial para definir las metodologías de preparación de los nanobiocompuestos.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención y mantenimiento de *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis se obtuvo de la colección disponible en el Laboratorio de Estudios Básicos y Biotecnológicos en Algas (LEBBA, CERZOS, CONICET-UNS). Se mantuvo en medio Basal de Bold (NaNO₃ 0,25 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0,025 g L⁻¹; K₂HPO₄ 0,075 g L⁻¹; KH₂HPO₄ 0,175 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0,075 g L⁻¹; NaCl 0,025 g L⁻¹; Na₂EDTA·2H₂O 1,0×10⁻³ g L⁻¹; H₃BO₃ 2,8×10⁻³ g L⁻¹; MnCl₂ 1,8×10⁻³ g L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0,2×10⁻³ g L⁻¹; Na₂MoO₄·2H₂O 0,4×10⁻³ g/L; CuSO₄·5H₂O 0,08×10⁻³ g L⁻¹; Co(NO₃)₂·5H₂O 0,05×10⁻³ g L⁻¹), en cámara de cultivo a una temperatura de 22±1 °C, bajo condiciones controladas de intensidad y exposición de luz de 60 μmoles de fotones m⁻² s⁻¹, provista por lámparas fluorescentes de luz blanca, y un fotoperíodo de 16:8 horas (luz:oscuridad). Las células se mantuvieron con agitación (30 rpm) y aireación constante a un pH=7, y se realizaron repiques quincenales (Scodelaro Bilbao et al., 2016).

2.2 Condiciones experimentales

Para llevar a cabo los experimentos, se emplearon cultivos *in vitro* en medio Basal de Bold (500 mL) en cámara de cultivo, bajo condiciones controladas de intensidad y exposición de luz (60 μmoles de fotones m⁻² s⁻¹; fotoperíodo de 16:8 h (luz: oscuridad), temperatura (22 ± 1°C), agitación (30 rpm), aireación constante y pH=7. Se utilizó un inóculo de 2,65 x 10⁴ cél mL⁻¹ en fase exponencial de crecimiento. Cada experimento se llevó a cabo durante 10 días.

2.3 Determinación de densidad celular

El número de células se determinó realizando recuentos celulares diarios empleando una cámara de Neubauer (n=2) (Scodelaro Bilbao et al., 2016)

2.4 Determinación del peso seco

Para la determinación de la biomasa, las muestras se filtraron a través de filtros Whatman GF/C pre-secados y pre-pesados. Luego, se colocaron en estufa durante 12 h a 80°C, se enfriaron en un desecador y finalmente se pesaron (n=2) (Scodelaro Bilbao et al., 2016; Scodelaro Bilbao et al.,2020b).

2.5 Análisis morfológico

El análisis se realizó mediante microscopía óptica empleando un microscopio Leitz. para evidenciar los cambios estructurales en *H. pluvialis*.

2.6 Determinación de propiedades bioquímicas

2.6.1 Contenido de clorofilas y carotenoides

La concentración de clorofilas y carotenoides se determinó mediante espectrofotometría de absorción molecular. Las células se recolectaron por centrifugación. El sedimento se resuspendió en un

volumen adecuado de metanol y se midió la absorbancia de los extractos resultantes a diferentes longitudes de onda según lo establecido por Jeffrey y Humphrey (1970).

2.6.2 Cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas, se realizó una lisis celular utilizando un buffer de composición: Tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 0,1%, NP-40 1%, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, NaF 50 mM, β -glicerofosfato 2 mM, Na_3VO_4 1 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, aprotinina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 0,5 mM y DTT 0,5 mM. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14.000 x g durante 20 minutos a 4°C. La cuantificación proteica se efectuó en una alícuota de 200 μL del sobrenadante obtenido, aplicando el método de Bradford (1976).

2.6.3 Determinación de la capacidad antioxidante

Se realizó sobre una alícuota de biomasa re-suspendida en metanol, utilizando el radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH., Sigma-Aldrich, USA) y según el protocolo descrito en Scodelaro Bilbao et al., 2016.

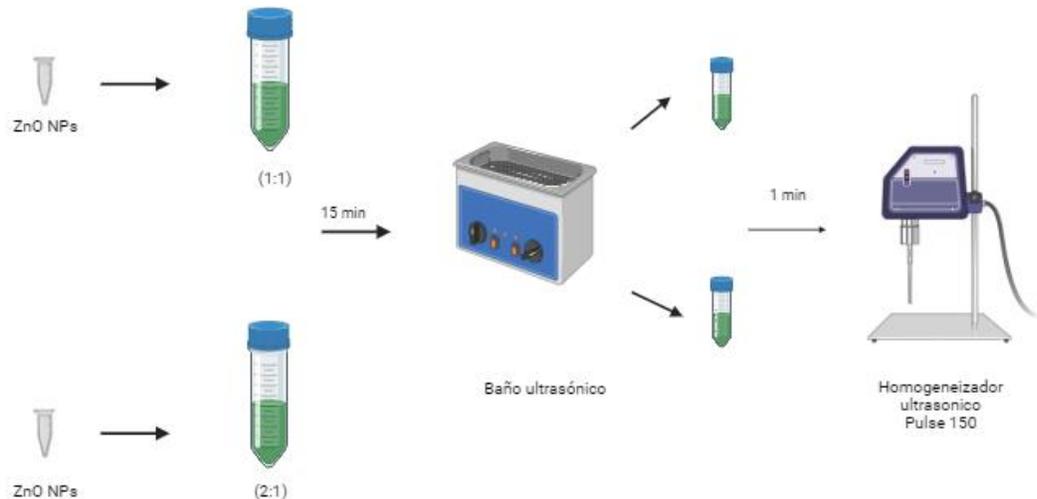
$$\text{capacidad antioxidante \%} = \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

2.6.4 Determinación de lípidos neutros

Los lípidos neutros se determinaron cualitativamente mediante la detección de la fluorescencia emitida por el colorante lipofílico Rojo Nilo (9-dietilamino) Appl Phycol 5H-benzo[alfa]fenoxazina-5-ona), a una longitud de onda de 577 nm (Scodelaro Bilbao et al., 2020; Almeyda et al., 2020).

2.7 Obtención de la dispersión de ZnO NPs en medio de *H. pluvialis* acuoso

La obtención de la dispersión de ZnO NPs en medio *H. pluvialis* acuoso se realizó a partir de nanopartículas de óxido de Zinc (ZnO NPs), previamente sintetizadas y caracterizadas en el grupo NanoHiAp (INQUISUR) según el procedimiento descrito en Pérez Adassus et al. (2022) Se emplearon dos relaciones en masa de ZnO NPs y *H. pluvialis* (1:1) y (2:1). A cada una de las muestras se las dispersó en 15 mL de agua destilada sometiendo cada una a tratamiento en baño de ultrasonido durante 15 minutos. Se intentó inducir interacciones entre ZnO NPs y la biomasa algal utilizando un homogeneizador por ultrasonido (PULSE 150) que posee una potencia de 150 W. Las condiciones de operación fijadas fueron: 7 pulsos con carga de ultrasonido de 75 W, temperatura 25 °C y un tiempo total de 1 minuto (Esquema 1), y se basaron en estudios realizados por el grupo NanoHiAp. Se dejaron secar en estufa 0,5 mL de la dispersión obtenida a temperatura de 45°C para la determinar la relación masa a volumen del producto de reacción.



Esquema 1. Resumen de las técnicas empleadas para la obtención de la dispersión. Realizada en biorrender.

2.8 Caracterización química de la dispersión obtenida (ZnO NPs – *H. pluvialis*)

2.8.1 Análisis del tamaño hidrodinámico (DLS)

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering) se emplea para determinar el perfil de distribución del tamaño hidrodinámico de nanopartículas en suspensión. Las partículas están en constante movimiento Browniano, cambiando permanentemente sus posiciones. El campo eléctrico dispersado, que depende de la posición cambia constantemente, entonces la intensidad de luz fluctúa en el tiempo. Las fluctuaciones de la intensidad de luz son inversamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las partículas. Con esta información, posteriormente podemos determinar el diámetro hidrodinámico según la ecuación de Stokes-Einstein:

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

2.8.2 Análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica emplea un haz de electrones para visualizar un objeto. La muestra empleada en este microscopio debe ser ultrafina (no mayor a 100 nm de espesor) y la imagen se obtiene de los electrones que la atraviesan, aportando también información sobre la estructura cristalina de la misma.

Para ver el contraste cristalino y el tamaño de los sistemas estudiados se prepararon dispersiones que, fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100 CX II, JEOL, Tokio, Japón (1983).

Del producto de la dispersión ZnO NPs – *H. pluvialis*, se prepararon dos relaciones (2:1) y (1:1) de 0,5 mL con 10 mL de agua destilada cada una. Luego, fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión.

2.8.3 Análisis de la carga superficial (potencial Z)

El potencial Z determina la carga superficial de las partículas. Como el valor del potencial Z no puede determinarse directamente, se calcula a partir de la movilidad electroforética, a partir del movimiento de una partícula cargada en relación al líquido en el que se encuentra dispersa al aplicar un campo eléctrico. Para ello, se coloca la muestra en dispersión en una celda de conductividad, se aplica un campo eléctrico y las partículas son atraídas por el electrodo de carga opuesta. Luego se emite un haz de luz láser que alcanza las partículas en movimiento induciendo un cambio de frecuencia por efecto Doppler. La diferencia resultante es proporcional a la movilidad electroforética y proporcional al valor de potencial z. Gracias al valor de potencial zeta se consigue saber el nivel de atracción o repulsión entre las diferentes partículas lo cual hace posible predecir su estabilidad eléctrica (Pérez Adassus et al., 2022).

Para analizar el potencial z de las muestras se prepararon en matraces de 10 mL soluciones de muestra con agua bidestilada y se dispersaron con la ayuda de ultrasonido. Luego, con la ayuda de una pipeta Pasteur, se introdujo la solución dentro de la celda de conductividad. Se determinó la carga superficial en función del pH. Para ello se realizaron medidas de potencial z a pH 5,8

2.9 Caracterización bioquímica de la dispersión obtenida (ZnO NPs – *H. pluvialis*)

Se emplearon los mismos abordajes detallados previamente en el punto 2.6.

2.10 Análisis estadístico

Se aplicó el test estadístico de Student para demostrar diferencias significativas entre condiciones experimentales. Fueron consideradas significativas si el valor de p estaba por debajo de 0,05 ($p < 0,05$; se indica con *), y altamente significativa si el valor de p estaba por debajo de 0,01 ($p < 0,01$; se indica con **).

3. Resultados

3.1. Cultivo de *Haematococcus pluvialis* y parámetros de crecimiento

En primer lugar, se evaluó la densidad celular y el peso seco de *H. pluvialis* cultivada bajo condiciones favorables de crecimiento, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 2.3). Como se puede observar en la Figura 1, ambos parámetros aumentaron exponencialmente con los días de cultivo y fueron significativamente mayores en el día 10, alcanzando valores máximos equivalentes a $3,27 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$ (cél. mL⁻¹) y $0,17 \pm 2,1 \times 10^{-5}$ (g L⁻¹), respectivamente.

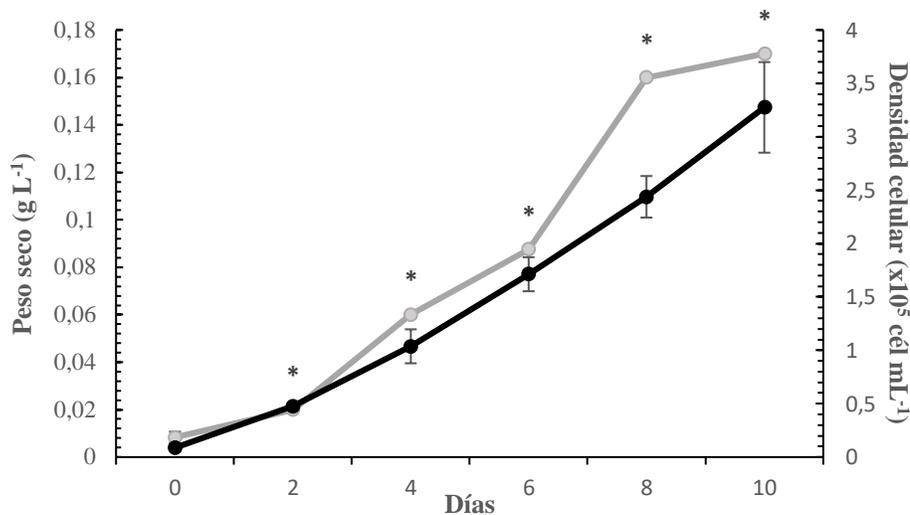


Figura 1. Cinética de crecimiento y producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis*. Se muestra la concentración de células (negro) y la producción de biomasa (gris) (promedio \pm desviación estándar, n=2), expresadas en células por litro (cél. mL⁻¹) y gramos por litro (g L⁻¹), respectivamente (n=2). * Hace referencia a diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$).

Para acompañar estos resultados, se llevaron a cabo observaciones mediante un microscopio óptico para documentar la transformación morfológica de *H. pluvialis* durante el desarrollo del experimento. Las transiciones morfológicas evidenciadas mostraron que se partió de células flageladas vegetativas verdes de forma elipsoidal (día inicial del experimento) (Fig. 2 A), hasta alcanzar el estadio de células no móviles, de forma esférica, con un remanente de clorofila periférica y un centro de color rojizo característico, debido a la presencia del carotenoide astaxantina (Fig. 2 B).

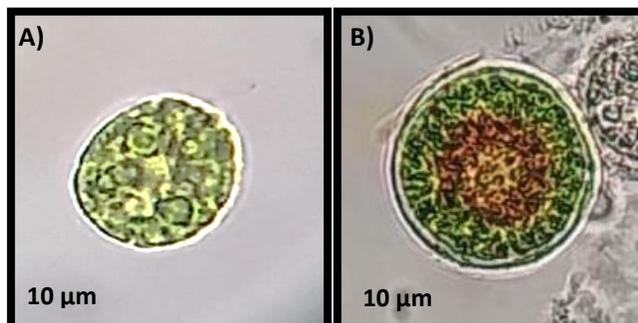


Figura 2. Cambios morfológicos evidenciados en *Haematococcus pluvialis*. Se presentan imágenes capturadas con microscopio óptico que ilustran la variación de forma y color que sufren las células a lo largo del desarrollo del experimento. Inicio del experimento (A); y al finalizar el mismo (B).

3.2. Análisis bioquímico de la biomasa

Se evaluó el contenido de pigmentos vegetales siguiendo el método propuesto por Jeffrey y Humphrey (1975). El mismo reveló que el contenido de clorofila *a + b* presentó diferencias significativas en el periodo de estudio. En el día inicial del cultivo, se observó que ambas clorofilas representaban ~50% del total; sin embargo, hacia el final del cultivo se observó un notable incremento en la concentración de clorofila *a* alcanzando un valor de $1120,38 \pm 25,34 \mu\text{g L}^{-1}$, siendo éste significativamente superior al obtenido para la clorofila *b* $703,02 \pm 24,34 \mu\text{g L}^{-1}$.

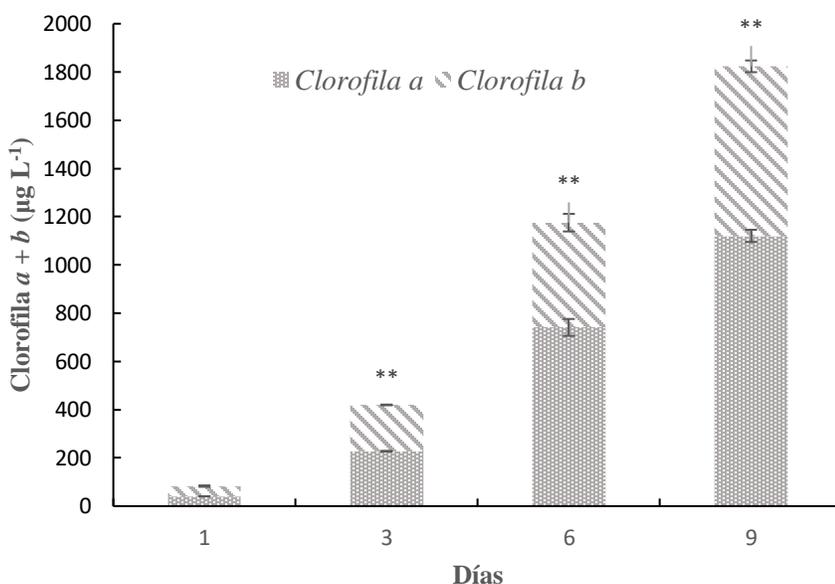


Figura 3. Evaluación del contenido de clorofilas en *Haematococcus pluvialis*. Determinación espectrofotométrica de la concentración de clorofilas *a + b* (en $\mu\text{g L}^{-1}$) en células cultivadas en condiciones óptimas durante 10 días. Se muestran las medias \pm desviación estándar; $n=2$; ** $p < 0,01$ donde el valor de p se refiere a diferencias altamente significativas.

La concentración promedio de carotenoides se presenta en la Figura 4. Allí, se observa que al inicio el contenido total de carotenoides fue de $42,37 \mu\text{g L}^{-1}$, experimentando un incremento significativo entre los días 3 (~300%) y 6 (~1100%), y en menor medida (~42%) entre los días 6 y 9. El máximo valor registrado fue de $753,35 \mu\text{g L}^{-1}$ y se alcanzó en el día final del experimento.

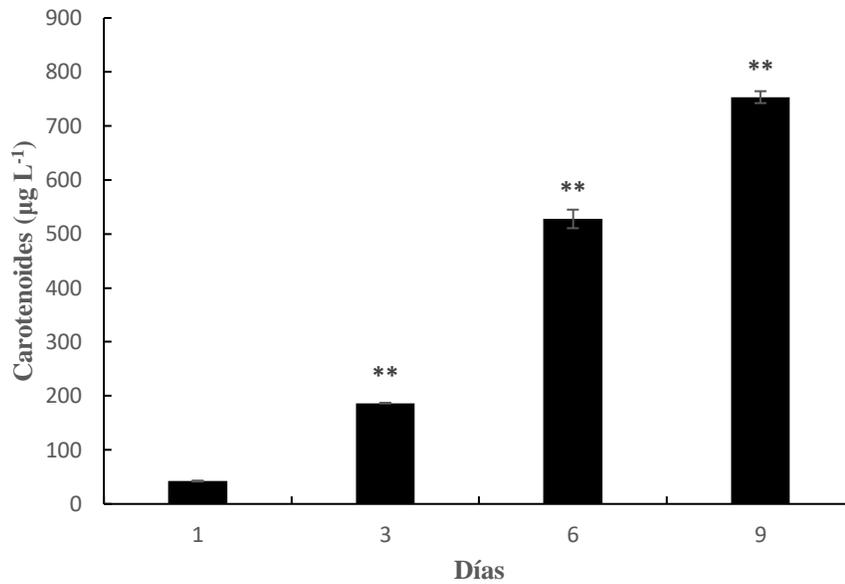


Figura 4. Producción de carotenoides en *Haematococcus pluvialis*. El gráfico muestra las concentraciones de carotenoides halladas en los días 1, 3, 6 y 9 de cultivo, expresadas en $\mu\text{g L}^{-1}$. Se muestran las medias \pm desviación estándar ($n=2$). ** $p < 0,01$ donde el valor de p se refiere a diferencias altamente significativas.

Posteriormente, se evaluó la capacidad antioxidante de la biomasa obtenida, evaluando espectrofotométricamente la estabilización del radical libre DPPH. La capacidad antioxidante máxima, expresada como porcentaje (%) y representada en la Figura 5, se registró en el final del experimento, alcanzando un valor de 78,55%. Sin embargo, durante los cuatro días de muestreo, se observó un incremento progresivo y estadísticamente significativo en día 6.

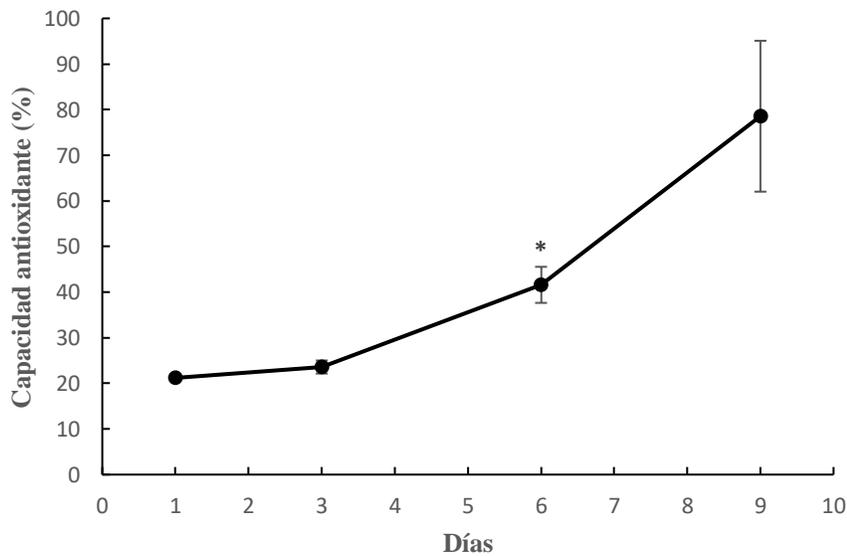


Figura 5. Capacidad antioxidante de *Haematococcus pluvialis*. El gráfico detalla la capacidad antioxidante de *H. pluvialis* determinada espectrofotométricamente empleando el radical libre DPPH. Los resultados muestran las medias \pm desviación estándar (n=2). * $p < 0,05$ se refiere a diferencias significativas.

También, se evaluó el contenido de proteínas de la biomasa mediante el método de Bradford (1976). Al inicio, la concentración de proteínas de la muestra se situó en $2,34 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1}$. A medida que transcurrieron los días de cultivo, se evidenció un incremento significativo, sostenido y notable en la concentración, alcanzando $10,56 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ en el tercer día. En el sexto día, la concentración aumentó a $26,94 \pm 1,41 \text{ mg L}^{-1}$. Finalmente, en el noveno día, la concentración de proteínas alcanzó el valor máximo de $42,92 \pm 3,14 \text{ mg L}^{-1}$.

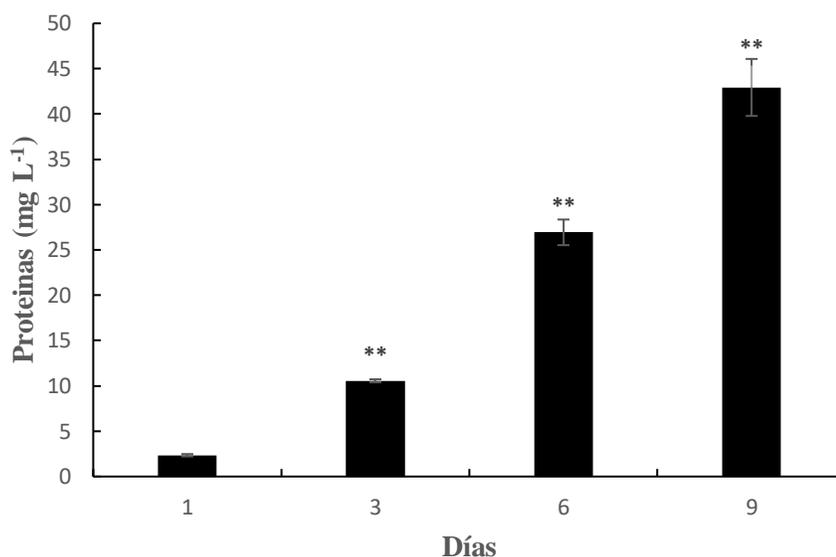


Figura 6. Evaluación del contenido de proteínas de *Haematococcus pluvialis*. Se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteínas en la biomasa de *H. pluvialis* cultivada en condiciones óptimas de crecimiento. El gráfico muestra los valores promedio \pm desviación estándar (n=2); ** $p < 0,01$ donde el valor de p se refiere a diferencias estadísticas altamente significativas.

Finalmente, se analizó la presencia de los lípidos neutros en la biomasa, aprovechando su fluorescencia en presencia del colorante lipofílico Rojo Nilo. Los resultados mostraron un aumento progresivo en la intensidad relativa de fluorescencia, partiendo de un valor de $7,19 \pm 1,97$ unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) y alcanzando un valor de $124,30 \pm 4,58$ UAF. Por lo tanto, la biomasa evidenció un aumento significativo de los lípidos neutros a lo largo del período estudiado.

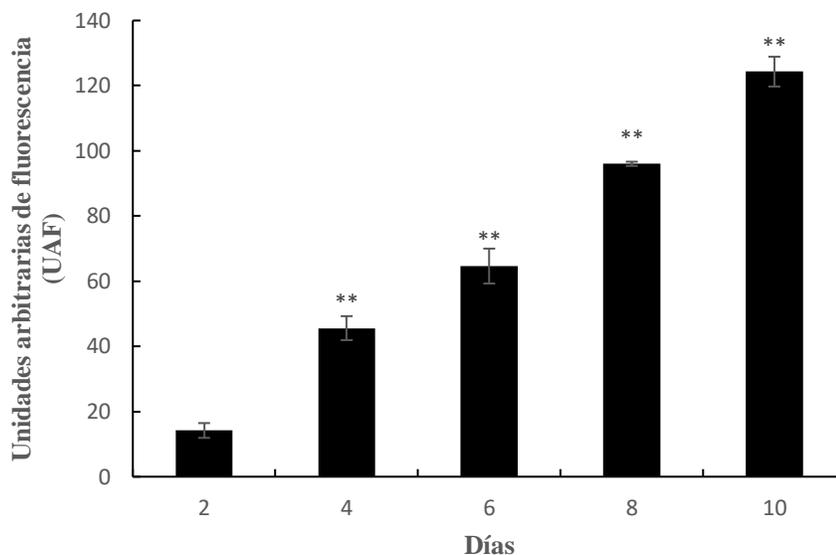


Figura 7. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los lípidos neutros en *Haematococcus pluvialis*. Se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF), se muestran los valores promedios \pm desviación estándar (n=2); ** p < 0,01 donde el valor de p se refiere a diferencias altamente significativas, ** p < 0,05 se refiere a diferencias estadísticas altamente significativas

3.3. Estudio de la interacción entre nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) y biomasa algal

Las interacciones entre las ZnO NPs y la biomasa algal se indujeron a partir del procedimiento descrito en la sección 2.7. Se utilizaron ZnO NPs previamente sintetizadas en el grupo NanoHiAp (INQUISUR) cuyas características principales se describen en Perez Adassus et al. 2022. En dicho trabajo se detallan las propiedades de las NPs obtenidas mediante la síntesis química por co-precipitación, revelando un valor de potencial zeta de $-13,5 \pm 0,21$ mV y una morfología hexagonal con formación de agregados de las nanopartículas en dispersión acuosa tal como se muestra en la microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la Figura 8.

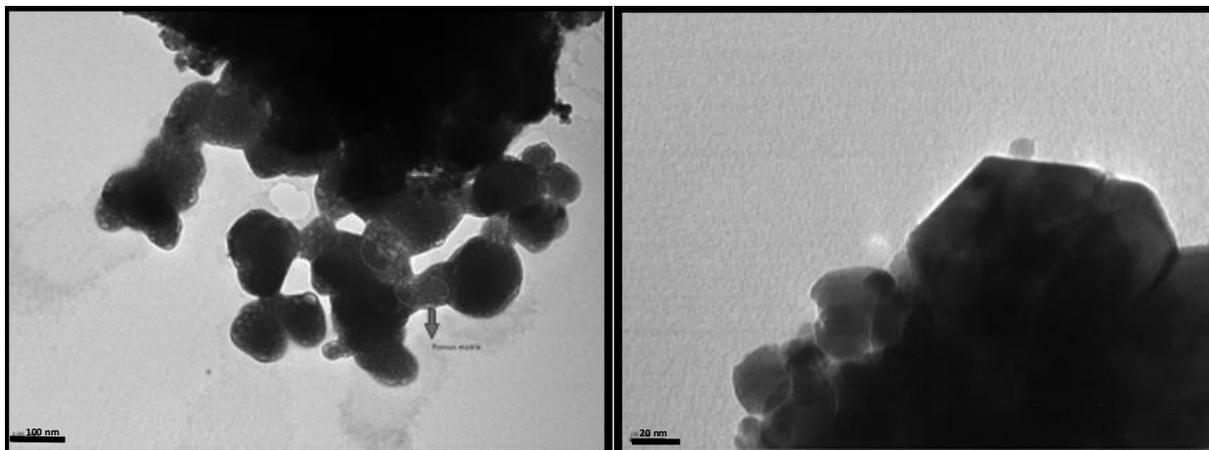


Figura 8. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de ZnO NPs. Extraído de Pérez Adassus et al., 2022.

La caracterización de la dispersión de ZnO NPs: biomasa algal (1:1) mediante TEM sugiere la presencia de dos fases con lo cual la formación de un nuevo compuesto a partir del tratamiento descrito 2.7 se descarta. En cambio, se evidenció la estabilización de las ZnO NPs debido a la presencia de biomasa dispersa en el medio acuoso, posiblemente atribuible a la adsorción de algunas fracciones de microalgas en la superficie de las NPs (Chen et al., 2012), y viceversa. Estos hallazgos se sustentan a partir de los resultados de TEM incluidos en la Figura 9, donde se observó la presencia de nanopartículas con una forma esférica, con bajos niveles de agregación, pero de mayor tamaño comparadas con las ZnO NPs dispersas en agua. En términos del aspecto que se observa por inspección visual, se obtuvo una solución acuosa de color verde, homogénea tal como se aprecia en la figura 10, cuya relación masa/volumen fue de $2,4 \text{ g L}^{-1}$ para la dispersión (1:1) de ZnO NPs : *H. pluvialis* y $2,8 \text{ g L}^{-1}$ para ZnO NPs : *H. pluvialis* (2:1). Además, se intentó determinar el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas en suspensión mediante la técnica descrita en la sección 2.8.1 en ambos casos. Sin embargo, las mediciones no alcanzaron los criterios de calidad establecidos por el equipo, posiblemente debido a la coloración intensa de las dispersiones.

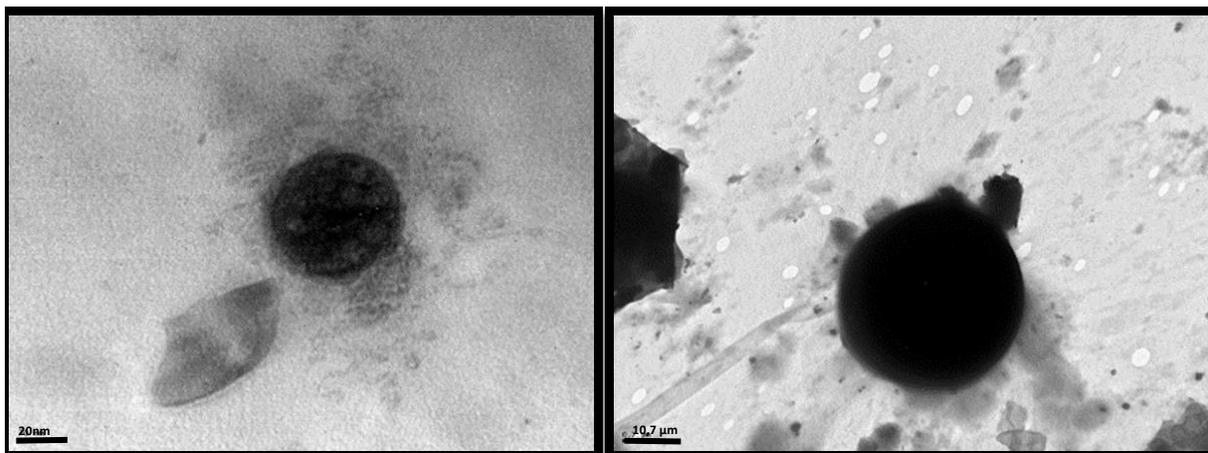


Figura 9. Imágenes de TEM de la dispersión ZnO NPs y biomasa algal de *Haematococcus pluvialis* respetando la misma proporción en ambas (1:1). Se observan NPs de forma esférica, con bordes lisos y sin formación de agregados.



Figura 10. Imagen del producto de la dispersión ZnO NPs y biomasa algal de *Haematococcus pluvialis*. A la izquierda se observa la dispersión preparada respetando la proporción ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1); y la derecha se observa la dispersión obtenida al emplear ZnO NPs : *H. pluvialis* (2:1). Se percibe la característica acuosa, color verde y homogeneidad de cada dispersión.

La carga superficial se estimó en términos de potencial zeta (ζ), obteniendo valores de $-18,00 \pm 1,55$ mV para la dispersión ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1) y $-19,50 \pm 0,14$ para la dispersión ZnO NPs : *H. pluvialis* (2:1) a un pH 5,8. En ambas, se observó un potencial zeta negativo independientemente de cada proporción empleada. Específicamente, la dispersión generada a partir de la proporción ZnO NPs : *H. pluvialis* (2:1) evidenció mayor estabilidad coloidal, indicado por la magnitud del potencial Z. De acuerdo a lo reportado, el aumento en la magnitud del potencial Z puede interpretarse como evidencia de equilibrios de adsorción de biomasa algal-NPs (Chen et al., 2012).

3.4. Propiedades bioquímicas de la dispersión ZnO NPs y biomasa algal

En última instancia, se procedió a evaluar las propiedades bioquímicas solamente de la dispersión de la condición ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1) ya que ambas dispersiones se comportaron de manera semejante. Los resultados obtenidos fueron contrastados con aquellos registrados para el cultivo de *H. pluvialis*.

Inicialmente, la evaluación de la concentración de los pigmentos fotosintéticos (primarios y secundarios) mostró una disminución de su contenido, dando como resultado para la clorofila *a* $0,71 \pm 0,13$ $\mu\text{g L}^{-1}$ y para la clorofila *b* $0,73 \pm 0,13$ y $0,380 \pm 0,010$ $\mu\text{g L}^{-1}$ para los carotenoides (Tabla 1). En todos los casos, se registró una marcada disminución de la concentración de pigmentos en la dispersión analizada.

Compuesto	<i>H. pluvialis</i> (día 9)	ZnO NPs : <i>H. pluvialis</i> (1:1)
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$1120,4 \pm 25,3$	$0,71 \pm 0,13^{**}$
Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$703,0 \pm 24,3$	$0,73 \pm 0,13^{**}$
Carotenoides ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$753,3 \pm 11,0$	$0,38 \pm 0,01^{**}$

Tabla 1. Cuantificación espectrofotométrica de cantidad de pigmentos. La tabla proporciona una comparación con la cantidad de clorofilas (*a* y *b*) y carotenoides de *H. pluvialis*. Los valores se muestran como las medias \pm desviaciones estándar (n=2). ** p < 0,01 donde el valor de p se refiere a diferencias altamente significativas.

Seguidamente, se evaluó la capacidad antioxidante de la dispersión, los resultados obtenidos coinciden con un aumento de la capacidad antioxidante esto puede relacionarse con la presencia de las ZnO NPs que aumentan las actividades de enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa y glutatión peroxidasa (Mofeed, 2020)

	<i>H. pluvialis</i> (día 9)	ZnO NPs : <i>H. pluvialis</i> (1:1)
Capacidad antioxidante (%)	78,5 \pm 16,5	84,9 \pm 2,9

Tabla 4. Capacidad antioxidante de la dispersión ZnO NPs: *H. pluvialis*. La tabla proporciona una comparación de la capacidad antioxidante de la dispersión con la biomasa microalgal. Los valores se muestran como las medias \pm desviaciones estándar (n=2).

El contenido de proteínas también disminuyó significativamente en la dispersión ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1), alcanzando un valor de 1,06 \pm 0,09 mg L⁻¹ el cual se encuentra muy por debajo de aquel registrado para la biomasa de *H. pluvialis*. Los resultados se observan en la Tabla 3.

	<i>H. pluvialis</i> (día 9)	ZnO NPs : <i>H. pluvialis</i> (1:1)
Proteínas (mg L ⁻¹)	42,9 \pm 3,1	1,06 \pm 0,09**

Tabla 3. Concentración de proteínas de la dispersión ZnO NPs: *H. pluvialis*. La tabla proporciona una comparación de las concentraciones obtenidas de la dispersión con la biomasa microalgal. Los valores se muestran como las medias \pm desviaciones estándar, (n=2). ** p < 0,01 se refiere a diferencias altamente significativas.

Por último, la cuantificación de la intensidad de fluorescencia del colorante Rojo Nilo en presencia de lípidos neutros (LN) en la dispersión (1:1) registró un valor significativamente menor al obtenido para la biomasa de *H. pluvialis*, siendo el mismo de 0,69 \pm 0,14 UAF. Los resultados completos se observan en la Tabla 2.

	<i>H. pluvialis</i> (día 9)	ZnO NPs : <i>H. pluvialis</i> (1:1)
Lípidos neutros (UAF)	124,3 \pm 4,6	0,69 \pm 0,14**

Tabla 2. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de los lípidos neutros de la dispersión ZnO NPs: *H. pluvialis*. La tabla proporciona una comparación de ambas cuantificaciones. Los valores se muestran como las medias \pm desviaciones estándar (n=2). ** p < 0,01 se refiere a diferencias altamente significativas.

4. Discusión

Bajo condiciones óptimas de crecimiento, *H. pluvialis* exhibe una notable abundancia de macromoléculas orgánicas, aunque su contenido puede variar en comparación con otras microalgas (Grewe & Griehl, 2012). En términos de concentración de clorofilas, suele presentar niveles más bajos que otras microalgas fotosintéticas, esto se atribuye a su capacidad de acumular astaxantina y adoptar una fase no fotosintética durante determinadas etapas de su ciclo de vida (Zhang et al., 2016). Los valores de clorofila fluctúan según las condiciones específicas de cultivo y el estado fisiológico de la microalga, generalmente manteniéndose en el rango de 1-15 mg L⁻¹ durante la etapa verde, lo cual es relativamente bajo en comparación con *Chlorella vulgaris*, otra alga verde que suele mostrar niveles entre 20-50 mg L⁻¹ (Chekanov et al., 2014; Kim et al., 2015; Tavares et al., 2022). No obstante, Suyono y colaboradores (2015) examinaron el comportamiento *H. pluvialis* sometiéndola a varias condiciones de estrés durante un intervalo de tiempo. Al hacerlo, observaron que, durante la fase de crecimiento vegetativo en condiciones óptimas, previa a la acumulación de astaxantina, el contenido de clorofilas tiende a ser más elevado, alineándose esta concentración con la de otras microalgas verdes. En nuestro estudio, los resultados obtenidos para el contenido total de clorofilas de *H. pluvialis* bajo condiciones óptimas de crecimiento fueron consistentes con estos hallazgos, registrándose ~1,8 mg L⁻¹ lo cual se encuentra dentro del rango esperable para esta especie.

Además de las clorofilas *a* y *b*, la fracción de pigmentos de las células vegetativas verdes de *H. pluvialis*, se compone principalmente de los carotenoides luteína (75 a 80%), β-caroteno (10 a 20%), carotenoides primarios, violaxantina, neoxantina y zeaxantina (Shah et al., 2016). Según lo reportado, bajo condiciones de crecimiento adversas, *H. pluvialis* sufre un aumento significativo en el contenido total de carotenoides. En ese momento, el patrón característico de carotenoides primarios de la etapa vegetativa es sustituido por carotenoides secundarios, principalmente astaxantina (80-99% del total). En nuestro caso, se identificó, mediante microscopía óptica, un estadio verde inicial seguido de estadios en los cuales se evidenció un incipiente depósito de color rojo, bajo la forma de un halo pericentral, muy probablemente debido a la presencia de astaxantina. Esto denota que, hacia el final de cada experimento, se alcanza la fase de crecimiento exponencial tardía, o bien, el inicio de la fase estacionaria. La determinación espectrofotométrica de carotenoides evidenció un aumento en la concentración de estos pigmentos, sin embargo, aún desconocemos las especies moleculares que conforman esta fracción.

Frente a una elevada intensidad lumínica, *H. pluvialis* sintetiza gran cantidad de ácidos grasos (AG). La biosíntesis de éstos ocurre principalmente en los cloroplastos, los mismos luego se trasladan hacia el citoplasma conduciendo a la formación de lípidos neutros (LN), específicamente de triglicéridos (TAG) almacenados en cuerpos lipídicos (Holtin et al., 2009; Ota, et al., 2018, Mehariya et al., 2020; Scodelaro Bilbao et al., 2016; Scodelaro Bilbao et al., 2020). Este aumento en el contenido de TAG como respuesta al

estrés, fue también reportado en otras especies de microalgas verdes como *Parietochloris incisa* en cultivos privados de nitrógeno y condiciones lumínicas óptimas, y en cultivos con un contenido adecuado de nutrientes expuestos a alta intensidad lumínica (Solovchenko et al., 2008).

La cuantificación de los LN mediante Rojo Nilo en microalgas es variable y no siempre reproducible, dado que depende de las características de cada especie y de las condiciones de tinción (Elsey et al., 2007; Chen et al., 2009). A pesar de ello, esta técnica permite la detección *in situ* de los LN de manera rápida y sencilla. El análisis cinético de la acumulación de LN en cultivos de *H. pluvialis* reveló una asociación directa entre el contenido lipídico y el tiempo de cultivo. Durante los primeros días de cada experimento, se observaron aumentos menores en el contenido de LN. Un efecto similar fue observado por Lv y colaboradores (2010); mientras que Valenzuela-Espinoza y colaboradores (2002) registraron una ligera disminución en el contenido de lípidos de *Chlorella vulgaris* e *Isochrysis galbana* durante los primeros días de cultivo. Sin embargo, pese a ello, luego registraron un incremento en el contenido lipídico en las siguientes etapas correlacionándolo con la limitación de nutrientes. De acuerdo con estas observaciones, el punto crucial en el aumento considerable del contenido de LN en *H. pluvialis* se observó hacia el final de cada experimento, lo que sugiere que la acumulación de LN podría estar asociada a la disminución de nutrientes en el medio de cultivo y, por lo tanto, al acopio de moléculas de reserva como fuente de energía.

Los aminoácidos son moléculas necesarias para llevar a cabo procesos metabólicos. En el caso de las microalgas, muchas de las proteínas que las conforman contienen niveles aminoácidos esenciales cercanos a los niveles recomendados por la FAO para considerar a un alimento de buena calidad nutricional (FAO, 1990). En particular, en las microalgas verdes algunos de los aminoácidos esenciales principales son la valina, leucina y lisina encontrándose también histidina en concentraciones comparables a los niveles presentes en huevo y legumbres (Fleurence, 1999). Además, Kim y colaboradores (2015) reportaron que un 46% del contenido proteico de una cepa de *H. pluvialis* (KORDI03), recolectada y aislada en Corea, correspondía a aminoácidos esenciales, principalmente alanina y leucina. Esto denota la importancia de la fracción proteica proveniente de *H. pluvialis*. Sin embargo, el contenido de proteínas también varía con las diferentes fases de crecimiento de esta especie microalgal. Así, en la etapa verde esta especie posee un alto contenido proteico, representando alrededor del 29-45% de su peso seco; mientras que en la fase roja este valor disminuye a 21-23%. Esto implica que, a medida que la microalga empieza a acumular astaxantina, el contenido proteico disminuye (Mularczyk et al.; 2020). Al igual que en la literatura, el contenido de proteínas registrado en la especie utilizada en el presente trabajo mostró incrementos significativos durante todo el período estudiado, siendo esto afín con los reportes mencionados.

La pared celular de las microalgas consiste el primer sitio de interacción con otras moléculas. Cuando *H. pluvialis* se cultiva bajo condiciones óptimas de crecimiento, la pared celular se compone principalmente de celulosa y glicoproteínas, identificándose recientemente 81 proteínas estructurales

asociadas a esta fracción (Damiani et al, 2010). De acuerdo con Hagen y colaboradores (2002), cuando *H. pluvialis* es sometida a condiciones extremas tales como deficiencia de nutrientes o alta intensidad lumínica, ocurren cambios fisiológicos, como la acumulación de astaxantina; y cambios morfológicos, como el engrosamiento de la pared celular. Ésta pasa a estar formada por tres capas, compuestas por 70% de carbohidratos, 6% de proteínas y 3% de un biopolímero alifático con gran resistencia a los productos químicos (Damiani et al, 2006). Por lo tanto, estas moléculas jugarían un rol clave en la interacción con las nanopartículas que se registran en el presente estudio. Apoyando esta idea, Lin y colaboradores (2021) exploraron las interacciones entre la pared celular de *H. pluvialis* y enzimas fúngicas activadoras de carbohidratos. Sus resultados fundamentaron la idea de que la pared celular es el principal sitio de interacción con estas enzimas, las cuales descomponen la estructura para generar manooligómeros. En este sentido, Vinopal y colaboradores (2007) observaron que las paredes celulares tienen grupos funcionales que podrían propiciar diferentes tipos de interacciones con nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs) como interacciones electrostáticas, enlaces puente de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Los primeros tipos de interacciones podrían justificar el aumento del potencial Z de las NPs en la dispersión algal comparado con el que presentan las mismas NPs en medio acuoso. Es por ello que numerosos estudios buscan establecer estas interacciones, con el fin de impulsar la adopción de procedimientos ecológicos y sostenibles para obtención de nanobiomateriales con perspectivas en los campos de remediación ambiental, medicina y otras tecnologías (Chen et al., 2012; Vasistha et al., 2021). Sin embargo, aún no se encuentra evidencia documentada sobre la interacción entre *H. pluvialis* y ZnO NPs. A pesar de ello, en nuestros estudios se observó una estabilización de las NPs dispersas en la biomasa algal con un notable incremento de tamaño, la cual parece indicar una potencial adsorción por parte de las microalgas en la superficie de las NPs. La evidencia que respalda estas deducciones se centra en los datos provistos por micrografía electrónica de transmisión (TEM), la cual reveló nanopartículas de formas relativamente esféricas que se presentaron como entidades individuales con un bajo nivel de agregación, pero de tamaños muy superiores a las ZnO NPs dispersas en agua. En contraste, el trabajo de Pérez Adassus y colaboradores (2022) mostró a través de TEM, que las NPs dispersas en agua destilada exhibieron formas hexagonales y evidenciaron agregación. La carga superficial medida mediante potencial zeta, es otro indicador clave de la estabilidad coloidal (Mayoral et al., 2014). En nuestro experimento, el incremento en la magnitud del potencial Z de las ZnO NPs en el medio algal, como ya se mencionó, podría interpretarse como la adsorción de la biomasa algal sobre las NPs ya que se evidencian grupos cargados positivamente que contrarrestan la carga original de estas nanopartículas.

En términos de concentración de clorofilas y carotenoides, la concentración en la dispersión ZnO NPs : *H. pluvialis* (1:1) mostró una reducción considerable de la cantidad de ambos pigmentos. En relación a esto, diversos estudios han señalado el efecto tóxico de las nanopartículas de ZnO en diferentes especies de microalgas. Manzo y colaboradores (2013) expusieron que la presencia de una concentración de ZnO

NPs llevó a una reducción del crecimiento del 20-25% para *Dunaliella tertiolecta*, al igual que en Vasistha et al. (2021) donde notaron un patrón similar en los pigmentos fotosintéticos. Esto sugiere que la presencia de NPs puede inducir una disminución del contenido de pigmentos fotosintéticos primarios y secundarios en las microalgas, observándose una reducción de la actividad del fotosistema I y II como consecuencia de ellos. A su vez, se ha reportado que las NPs también pueden inhibir la síntesis de estos pigmentos y/o favorecer su degradación (Mahana et al., 2021).

La dispersión nanopartículas-biomasa microalgal también evidenció una reducción altamente significativa en la concentración de proteínas y LN. En el estudio de Kaliampurthi y colaboradores (2019), se registró un aumento de 6 veces en los LN en *Chlorella sp.* luego de ser expuesta a ZnO NPs (50 mg L^{-1}). Esto permite deducir que la presencia de NPs puede influir en la síntesis y acumulación de estos metabolitos. Cuando las NPs ejercen menor toxicidad, la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión S-transferasa y la peroxidasa microalgales aumenta, para contrarrestar la toxicidad inducida por las especies reactivas del oxígeno. Sin embargo, en presencia de concentraciones más significativas de NPs, el sistema de defensa antioxidante de las microalgas podría estar abrumado, conduciendo a la inhibición de la actividad enzimática, el bloqueo de la absorción de nutrientes, la disminución de la eficiencia fotosintética y, en casos extremos, la deformación de las paredes celulares provocando daño celular (Wang et al., 2019).

5. Conclusiones

A partir del cultivo de *H. pluvialis* en condiciones controladas y durante 10 días, se obtuvo biomasa que evidenció un aumento significativo en diversas moléculas con actividad biológica como pigmentos, lípidos y proteínas. También se observó un incremento en su capacidad antioxidante. Esta biomasa se empleó como materia prima para el potencial desarrollo de nanobiocompuestos. Para lograrlo, se ensayó un protocolo empleando también nanopartículas de óxido de zinc (ZnO NPs). Sin embargo, en su lugar se obtuvo una dispersión ZnO NPs: *H. pluvialis* que evidenció propiedades bioquímicas diferentes respecto a la biomasa microalgal empleada.

El creciente interés respecto de la amplia gama de biomoléculas sintetizadas por *H. pluvialis*, así como los conocimientos que se van adquiriendo en cuanto a su capacidad de respuesta frente a cambios en su entorno y las vías metabólicas que intervienen y su conjunción con herramientas provenientes del área tecnológica prometen alcanzar grandes avances en un futuro cercano. Además, las potenciales interacciones con otros elementos, como las nanopartículas, abre nuevos paradigmas. De esta manera, el enfoque planteado en la presente tesis de grado podría extrapolarse para evaluar las interacciones entre diversas clases de organismos acuáticos y diversas nanopartículas, ampliando así el alcance más allá de las algas y las ZnO NPs. Este abordaje contribuirá a establecer una base de datos completa para comprender qué sucede ante la liberación ambiental de nanomateriales y evaluar así su mitigación. Además, dadas las características diferenciales de las nanopartículas en dispersión junto a la biomasa microalgal, existe un potencial para el desarrollo de nanobiocompuestos con aplicaciones en el mercado industrial, tecnológico o médico

6. Referencias bibliográficas

- Adassus, M. B. P., Spetter, C. V., & Lassalle, V. L. (2022). Biofabrication of ZnO nanoparticles from *Sarcocornia ambigua* as novel natural source: A comparative analysis regarding traditional chemical preparation and insights on their photocatalytic activity. *Journal of Molecular Structure*, *1256*, 132460.
- Alam, F., Date, A. S., Rasjidin, R., Mobin, S., Moria, H., & Baqui, A. (2012). Biofuel from algae- Is it a viable alternative?. *Procedia Engineering*, *49*, 221–227.
- Almeyda, M. D., Scodelaro Bilbao, P. G., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2020). Enhancement of polyunsaturated fatty acid production under low-temperature stress in *Cylindrotheca closterium*. *Journal of Applied Phycology*, *32*, 989-1001.
- Betancur Henao, Claudia Patricia, Hernández Montes, Vanessa, & Buitrago Sierra, Robison. (2016). Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, *35(4)*, 387-402.
- Boussiba, S. (2000), Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, *108*: 111-117.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, *72(1-2)*, 248–254.
- Britto Hurtado, R., Cortez-Valadez, M., & Flores- Acosta, M. (2022). Aplicaciones tecnológicas de las nanopartículas en la medicina e industria. *EPISTEMUS*, *16(33)*, 46–54.
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. (2014). Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). *Marine drugs*, *12(8)*, 4504-4520.
- Chen, W., Zhang, C., Song, L., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2009). A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. *Journal of microbiological methods*, *77(1)*, 41-47.
- Chen, P., Powell, B. A., Mortimer, M., & Ke, P. C. (2012). Adaptive interactions between zinc oxide nanoparticles and *Chlorella sp.* *Environmental science & technology*, *46(21)*, 12178–12185.
- Damiani, M. C., Leonardi, P. I., Pieroni, O. I., & Cáceres, E. J. (2006). Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. *Phycologia*, *45(6)*, 616-623.

Damiani, M. C., Popovich, C. A., Constenla, D., & Leonardi, P. I. (2010). Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, *101*(11), 3801–3807.

Else, D., Jameson, D., Raleigh, B., & Cooney, M. J. (2007). Fluorescent measurement of microalgal neutral lipids. *Journal of microbiological methods*, *68*(3), 639-642.

Fleurence, J. (1999). The enzymatic degradation of algal cell walls: a useful approach for improving protein accessibility?. *Journal of Applied Phycology*, *11*(3), 313-314.

Gutiérrez González, L., Hernández Jiménez, M. J., & Molina Borchert, L. (2013). Daños para la salud tras exposición laboral a nanopartículas. *Medicina y Seguridad del Trabajo*, *59*(231), 276-296.

Grewe, C. B., & Griehl, C. (2012). The carotenoid astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy eds C. Posten and C. Walter (Berlin)*, 129-144.

Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, *37*(2), 217-226.

Hernández Morales, K. J., Pérez Morales, M. E., Jáuregui Romo, C., Alcántara Jurado, L. A., & Hurtado Ayala, L. A. (2015). Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, *46*(1), 7-16.

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, *49*(2), 157-173.

Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G., & Albert, K. (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *395*, 1613-1622.

Jeffrey, S. W., & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie Und Physiologie Der Pflanzen*, *167*(2), 191–194.

Kaliamurthi, S., Selvaraj, G., Cakmak, Z. E., Korkmaz, A. D., & Cakmak, T. (2019). The relationship between *Chlorella sp.* and zinc oxide nanoparticles: Changes in biochemical, oxygen evolution, and lipid production ability. *Process Biochemistry*, *85*, 43-50.

Kim, Ji Hyung & Affan, Md & Jang, Jiyi & Kang, Mee hye & Ko, Ah-Ra & Jeon, Seon-Mi & Oh, Chulhong & Heo, Soo-Jin & Lee, Youn-Ho & Ju, Se-Jong & Kang, Do-Hyung. (2015). Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus* sp KORDI03 (*Haematococcaceae*, *Chlorophyta*) Isolated from Korea. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25.

Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94–97.

LA FAO, U. C. E. (1990). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

Li-Beisson, Y., Thelen, J. J., Fedosejevs, E., & Harwood, J. L. (2019). The lipid biochemistry of eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 74, 31-68.

Lin, J., Yan, H., Zhao, L., Li, Y., Nahidian, B., Zhu, M., ... & Han, D. (2021). Interaction between the cell walls of microalgal host and fungal carbohydrate-activate enzymes is essential for the pathogenic parasitism process. *Environmental Microbiology*, 23(9), 5114-5130.

Lv, J. M., Cheng, L. H., Xu, X. H., Zhang, L., & Chen, H. L. (2010). Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource technology*, 101(17), 6797-6804.

Mahana, A., Guliy, O. I., & Mehta, S. K. (2021). Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111662.

Manzo, S., Miglietta, M. L., Rametta, G., Buono, S., & Di Francia, G. (2013). Toxic effects of ZnO nanoparticles towards marine algae *Dunaliella tertiolecta*. *Science of the Total Environment*, 445, 371-376.

Mayoral, A., Deepak, F. L., Esparza, R., Casillas, G., Magen, C., Perez-Tijerina, E., & Jose-Yacaman, M. (2012). On the structure of bimetallic noble metal nanoparticles as revealed by aberration corrected scanning transmission electron microscopy (STEM). *Micron*, 43(4), 557-564.

Mehariya, S., Sharma, N., Iovine, A., Casella, P., Marino, T., LaroCCA, V., Molino, A., Musmarra, D. (2020). An Integrated Strategy for Nutraceuticals from *Haematococcus pluvialis*: From Cultivation to Extraction. *Antioxidants*, 9(9), 825

Mofeed, J. (2020). Impacts of ZnO nanoparticles on growth and antioxidant enzymes of the green alga *Scenedesmus obliquus*. *African Journal of Biological Sciences*, 2(4), 33-44.

Montero-Sánchez, Y. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. *Revista Científica Interdisciplinaria Investigación Y Saberes*, 1(2), 37-43.

Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs*, 18(9), 459.

Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., ... Kawano, S. (2018). Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*, 8(1).

Pardo, L., Arias, J., & Molleda, P. (2022). Elaboración de nanopartículas de plata sintetizadas a partir de extracto de hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y su uso como conservante. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 35(1), 45-58.

Rao, A. R., Sindhuja, H. N., Dharmesh, S. M., Sankar, K. U., Sarada, R., & Ravishankar, G. A. (2013). Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3842–3851.

Ren, Y., Deng, J., Huang, J., Wu, Z., Yi, L., Bi, Y., & Chen, F. (2021). Using green alga *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin and lipid co-production: Advances and outlook. *Bioresource technology*, 340, 125736.

Salehi, M., Biria, D., Shariati, M., & Farhadian, M. (2019). Treatment of normal hydrocarbons contaminated water by combined microalgae - Photocatalytic nanoparticles system. *Journal of environmental management*, 243, 116–126.

Scodelaro Bilbao, P. G., Damiani, C., Salvador, G. A., & Leonardi, P. (2016). *Haematococcus pluvialis* as a source of fatty acids and phytosterols: potential nutritional and biological implications. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3283–3294.

Scodelaro Bilbao, P. G., Martín, L. A., Popovich, C. A., Almeyda, M. D., Chamorro, V., & Leonardi, P. I. (2020). Assessment of *Halamphora coffeaeformis* growth and biochemical composition for aquaculture purposes. *Journal of Marine Science and Engineering*, 8(4), 282.

Scodelaro Bilbao, P. G., Garelli, A., Diaz, M., Salvador, G. A., & Leonardi, P. I. (2020). Crosstalk between sterol and neutral lipid metabolism in the alga *Haematococcus pluvialis* exposed to light stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 158767.

Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in plant science*, 7, 531.

Solovchenko, A. E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., & Merzlyak, M. N. (2008). Effects of light intensity and nitrogen starvation on growth, total fatty acids and arachidonic acid in the green microalga *Parietochloris incisa*. *Journal of applied Phycology*, 20, 245-251.

Suyono, E. A., Pradani, L., Mu'avatun, U., Habiba, R. N., & Rohma, E. F. (2015). Combination of blue, red, white, and ultraviolet lights for increasing carotenoids and biomass of microalga *Haematococcus pluvialis*. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 399-405.

Tavares, L., Nudi, M. H., Arroyo, P. A., Godoy, R. F. B., & Trevisan, E. (2022). Effect of different concentrations of phosphorus and nitrogen on the growth of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Energy and Environmental Engineering*, 1-10.

Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., & Núñez-Cebrero, F. (2002). Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll a content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquacultural Engineering*, 25(4), 207-216.

Vasistha, S., Khanra, A., & Rai, M. P. (2021). Influence of microalgae-ZnO nanoparticle association on sewage wastewater towards efficient nutrient removal and improved biodiesel application: An integrated approach. *Journal of Water Process Engineering*, 39, 101711.

Vinopal, S., Ruml, T., & Kotrba, P. (2007). Biosorption of Cd²⁺ and Zn²⁺ by cell surface-engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(2), 96-102.

Wang, F., Guan, W., Xu, L., Ding, Z., Ma, H., Ma, A., & Terry, N. (2019). Effects of nanoparticles on algae: Adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Sciences*, 9(8), 1534.

Zhang, T. Y., Hu, H. Y., Wu, Y. H., Zhuang, L. L., Xu, X. Q., Wang, X. X., & Dao, G. H. (2016). Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 60, 1602-1614.