

Research Article

Efecto de la radiación ultravioleta B en la producción de polifenoles en la microalga marina *Chlorella* sp.

Jaime Copia¹, Hernán Gaete^{2,3}, Gustavo Zúñiga⁴, María Hidalgo¹ & Enrique Cabrera¹

¹Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile

²Departamento Biología y Ciencias Ambientales, Universidad de Valparaíso, Av. Gran Bretaña 1111 Playa Ancha, Valparaíso, Chile

³Centro de Investigación y Gestión de Recursos Naturales CIGREN, Universidad de Valparaíso Av. Gran Bretaña 1111, Playa Ancha, Valparaíso, Chile

⁴Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Avenida Bernardo O'Higgins 3363 Santiago de Chile, Chile

RESUMEN. Las algas marinas son una fuente importante de compuestos antioxidantes (fenoles y polifenoles), generados como mecanismos de defensa frente a factores de estrés (radiación UV, temperatura, herbívora). El objetivo de este trabajo es evaluar la estrategia de adaptación al efecto de la radiación ultravioleta B (RUV-B, 280-315 nm) en la microalga marina *Chlorella* sp. mediante la producción de polifenoles y capacidad antioxidante total. Se expusieron cultivos de *Chlorella* sp. fueron expuestos a radiación UV-B ($470 \mu\text{W cm}^{-2}$) por periodo de tiempos ascendentes. Se evaluó la capacidad antioxidante total DPPH, polifenoles totales, clorofila-*a* y *b* así como la densidad celular en cultivos expuestos y no expuestos. Los resultados indicaron que la RUV-B genera una disminución de la densidad celular en los cultivos irradiados por primera vez (1ª etapa), existiendo un aumento significativo ($P < 0,05$ inferior al control) en la 2ª y 3ª etapa sólo hasta la 4ª etapa (día 7), correspondiente a una dosis de 16920 J m^{-2} . La producción de fenoles totales se incrementó significativamente ($P < 0,05$) para el extracto IVa respecto al control, confirmando que la exposición frente a la RUV-B provoca una respuesta de las microalgas, generando mayores niveles de sustancias fotoprotectoras. La capacidad antioxidante total y fenoles totales no presentó una correlación significativa ($R^2 = 0,72$), dada la no especificidad del método DPPH para este tipo de antioxidantes, pero sí una tendencia muy similar. Aunque las cantidades de compuestos antioxidantes no fueron elevadas, su síntesis corresponde a la respuesta desarrollada por la microalga *Chlorella* sp. frente a RUV-B. La exposición de la microalga *Chlorella* sp. a dosis incrementales de RUV-B, repetidas en el tiempo provoca la respuesta mediante del incremento de las defensas antioxidantes.

Palabras clave: antioxidantes, *Chlorella* sp., radiación ultravioleta B, capacidad antioxidante total, polifenoles totales.

Effect of ultraviolet B radiation on the production of polyphenols in the marine microalga *Chlorella* sp.

ABSTRACT. Marine algae are an important source of antioxidant compounds (phenols and polyphenols), generated as defense mechanisms against stress factors (UV radiation, temperature, herbivory). The aim of this study was to evaluate the strategy of adaptation to the effect of ultraviolet B radiation (UV-B, 280-315 nm) in the marine microalga *Chlorella* sp. through, the production of polyphenols and total antioxidant capacity. *Chlorella* sp. cultures were exposed to UV-B radiation ($470 \mu\text{W cm}^{-2}$) over increasing time periods. We evaluated the total antioxidant capacity DPPH, total polyphenols, chlorophyll-*a* and *b*, and cell densities in exposed and unexposed cultures. The results indicated that UV-B caused a decrease in cell density in cultures irradiated for the first time (1st stage), with a significant increment ($P < 0.05$, lower than the control) in the 2nd and 3rd stages only through the 4th stage (day 7), corresponding to a dose of $16,920 \text{ J m}^{-2}$. The production of total phenols increased significantly ($P < 0.05$) for the IVth extract with respect to the control, confirming that the exposure to UV-B caused a reaction in the microalgae, generating higher levels of photoprotector substances. Total antioxidant capacity and total polyphenols did not show a significant correlation ($R^2 = 0.72$) due to the lack of specificity of the DPPH assay for this type of antioxidant, but a very similar trend was observed. Although the amounts of antioxidant compounds were not high, their synthesis corresponded to the

response developed by the microalgae *Chlorella* sp. against UV-B radiation. The exposure of the microalga *Chlorella* sp. to incremental doses of UV-B radiation, repeated over time, caused a response in the form of increasing antioxidant defenses.

Keywords: antioxidants, *Chlorella* sp., ultraviolet B radiation, total antioxidant capacity, total polyphenols.

Corresponding author: María E. Hidalgo (maria.hidalgo@uv.cl)

INTRODUCCIÓN

La radiación solar en el rango UV-B (280-315 nm) tiene un alcance a profundidades significativas, dependiendo de la presencia de compuestos luz-absorbentes como materia orgánica disuelta, organismos fotosintéticos y materia inorgánica (Hargreaves, 2003), produciendo un efecto ecológico en muchos ecosistemas de agua dulce y marinos (Hader *et al.*, 1998). Ha sido muy bien reportado el adelgazamiento de la capa de ozono estratosférico sobre la Antártica y Ártico, así como disminuciones moderadas (20-30%) de éste sobre la columna de agua a partir de los 79°N y latitudes medias (a partir de los 27°N) (Hader *et al.*, 1998). Los efectos deletéreos del estrés producidos por la radiación UV en microalgas incluyen la inhibición de la fotosíntesis (Hughes, 2006); daño al ADN, proteínas y lípidos (Karentz *et al.*, 1991); generación de especies reactivas de oxígeno ROS (Estévez *et al.*, 2001) e inhibición en la asimilación de nutrientes (Shelly *et al.*, 2006).

El estrés oxidativo es definido como la producción creciente de especies ROS, en cantidades que exceden las defensas antioxidantes celulares (Moskaug *et al.*, 2005). La consecuencia del estrés oxidativo puede involucrar daño a lípidos, proteínas y ADN, con el desarrollo de patologías y el envejecimiento subsecuente (Finkel & Holbrook, 2000). Los vegetales sintetizan compuestos bioactivos con características antioxidantes, conteniendo diversas estructuras fitoquímicas, cuya mayor fracción está conformada por polifenoles (Scalbert & Williamson, 2000), encontrando taninos, lignanos y flavonoides (Kuskoski *et al.*, 2004). Muchos polifenoles tienen características antioxidantes (*e.g.* reductoras) y pueden reaccionar directamente con las especies reactivas ROS, formando productos menos reactivos (Moskaug *et al.*, 2005). Estos compuestos fitoquímicos son producidos por las plantas como mecanismo de defensa a diversos factores que pueden provocar estrés, como herbivoría (Pavia *et al.*, 1997), radiación ultravioleta (UV) (Malanga *et al.*, 1995, 1997; Cantos *et al.*, 2000; Duval *et al.*, 2000; Zudaire & Roy, 2001; Rijistenbil, 2002; Hernandez *et al.*, 2005, 2006; Bouchard *et al.*, 2005; Janknegt *et al.*, 2009) y variaciones de temperatura (Wong *et al.*, 2007).

Muchos organismos producen diferentes sustancias capaces de absorber luz ultravioleta (Cockell & Knowland, 1999; Rozema *et al.*, 2002). Dentro de estos compuestos se encuentran los denominados "pantalla" como las MAAs (Mycosporine-like aminoacids) producidas por muchas algas y algunas cianobacterias (Björn, 2007). Estudios en plantas vasculares han demostrado que la RUV-B (280-315 nm) estimula las vías de producción de algunos metabolitos incluyendo polifenoles y flavonoles (Tevini, 1993) que han demostrado ser compuestos atrapadores de radiación UV (Reuber *et al.*, 1996), reduciendo al máximo los daños en las funciones fisiológicas normales de sus tejidos. Además, existen trabajos que evidencian la presencia de compuestos fotoprotectores de radiación UV en algas (García-Pichel *et al.*, 1992; Gómez *et al.*, 1998; Hoyer *et al.*, 2001).

Se han realizado diversos estudios en macro y microalgas: *Chlamydomona nivalis* (Duval *et al.*, 2000), *C. augustae*, *Naviculla incerta* (Wong *et al.*, 2007), *Chlorella* sp. (Estévez *et al.*, 2001; Vimalabai & Kulandaivelu, 2002; Wong *et al.*, 2007), *Isochrysis galbana* (Vimalabai & Kulandaivelu, 2002), *Ascophyllum nodosum* (Pavia *et al.*, 1997) y *Ulva fasciata* (Shiu & Lee, 2005), entre otras, para evaluar la resistencia y el efecto a la exposición de radiación UV. Existen evidencias que organismos como las microalgas pueden presentar respuestas adaptativas a la exposición de radiación UV, aumentando los niveles de polifenoles a modo de fotoprotección (Estévez *et al.*, 2001; Duval *et al.*, 2000). Este proceso puede ser utilizado como un mecanismo de gran utilidad para la producción de antioxidantes de origen natural, la selección de organismos vegetales más adaptados y su exposición a radiaciones UV controladas para aumentar la producción de fitocompuestos (polifenoles) a través de la respuesta fotoprotectora de estas algas. Dada la importancia que revisten las microalgas en los ecosistemas acuáticos en la producción primaria y tramas tróficas, resulta importante conocer la capacidad de respuesta de estos organismos a la RUV-B. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es evaluar la estrategia de adaptación al efecto de la radiación ultravioleta B en la microalga marina *Chlorella* sp. a través de la producción de polifenoles y capacidad antioxidante total.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de cultivos

En todos los cultivos, la biomasa inicial fue de 4.150.000 células mL⁻¹ proveniente de un cultivo madre de *Chlorella* sp., obtenido en el Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Naturales, Universidad de Valparaíso. A partir de éste se inició un cultivo stock de 50 mL utilizando agua destilada y medio nutritivo, compuesto por cinco soluciones stock, las cuales contenían: micronutrientes, macronutrientes, Fe-EDTA, elementos traza y NaHCO₃ (agregado sólo en el tiempo inicial) descrito por la Norma Chilena Oficial (NCh 2706.Of2002), bajo luz PAR (Photosynthetically Active Radiation) con una exposición a luz continua de intensidad $190 \pm 10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de 24 h luz y temperatura ambiente (18-20°C). Los cultivos fueron mantenidos bajo las mismas condiciones que el cultivo stock hasta alcanzar la fase exponencial, determinada a través de conteos celulares diarios, con un microscopio óptico, utilizando una cámara de Neubauer, determinándose la fase de crecimiento de los cultivos. La exposición a luz continua se mantuvo con la sola excepción del período de irradiación que se detalla en la siguiente sección.

Irradiación de cultivos

Para lograr el crecimiento microalgal que permitiera hacer las determinaciones de los parámetros medidos, se realizó preliminarmente una experiencia para determinar la intensidad de la radiación requerida ($470 \mu\text{W cm}^{-2}$). A partir del cultivo stock de *Chlorella* sp. se iniciaron cuatro nuevos cultivos, uno denominado "control" (C) (realizado por triplicado para cada uno de los cultivos) y tres "experimentales" (R1, R2 y R3), siendo estos últimos los que fueron expuestos a diferentes dosis de radiación UV-B. Por cada tratamiento se consideraron tres réplicas. En las etapas 1 a 3, la irradiación se realizó a partir del 5° día, durante tres días consecutivos por períodos de 10, 20 y 30 min respectivamente, correspondiente a dosis de 2820, 5640 y 8460 J m⁻² respectivamente con agitación manual cada 1 min. En la cuarta etapa los cultivos (R1, R2 y R3) fueron irradiados igualmente durante tres días consecutivos, pero 60 min cada día (16.920 J m^{-2}).

Diseño experimental

A partir del cultivo control y los cultivos experimentales (irradiados) de la primera etapa, al día siguiente de cada término de exposición, se obtuvieron los inóculos para iniciar la nueva etapa de cultivo (2ª etapa). Una vez iniciados los nuevos cultivos, se mantuvieron bajo las mismas condiciones que la etapa anterior, hasta

alcanzar el crecimiento exponencial. Posteriormente, los tres cultivos experimentales (R₁, R₂ y R₃) nuevamente fueron expuestos radiación UV-B ($470 \mu\text{W cm}^{-2}$) durante tres días consecutivos con dosis de 2.820, 5.640 y 8.460 J m⁻² con agitación manual cada 1 min (2ª y 3ª etapa). En la última etapa (4ª etapa) los cultivos fueron irradiados por tres días consecutivos 1 h (16.920 J m^{-2}) cada día, a fin de determinar el efecto deletéreo del aumento de la dosis de RUV-B. La determinación de los parámetros de capacidad antioxidante, polifenoles así como clorofila-*a* y *b* fueron determinados al finalizar cada etapa (1ª a 4ª) experimental.

Obtención de extractos

Al término de cada etapa de irradiación de cultivo (posterior a las irradiaciones) se tomaron 50 mL de cada cultivo (C, R₁, R₂, R₃) los cuales fueron centrifugados en tubos tipo Falcon (previamente pesados) a 4.000 rpm durante 15 min a 10°C con una centrifuga Hettich Universal K2S, el sobrenadante fue eliminado por trasvasije y se conservó el precipitado (células microalgas). Los tubos fueron pesados nuevamente para determinar la biomasa (peso húmedo) de microalgas y luego se agregó 1 mL de etanol p.a. al 99,9% por cada 200 mg de microalgas. Las células en etanol fueron sonicadas durante 2 h a temperatura ambiente en un sonicador Elma Transsonic T310. El homogenizado celular (células/etanol) obtenido después de la sonicación fue centrifugado a 4.000 rpm durante 10 min a 10°C, el precipitado fue descartado y el sobrenadante (extracto) fue guardado en tubos Eppendorf 1,5 mL, almacenados en frío y oscuridad para su posterior análisis. Esto se repitió al término de cada etapa de irradiación para las etapas 1, 2 y 3; sin embargo, en la 4ª etapa se realizó una extracción etanólica posterior a cada irradiación, por lo que el total de extractos algales obtenidos fueron seis (extractos I, II, III, IV(a), IV(b) y IV(c)). Las mediciones se hicieron inmediatamente después de cada etapa.

Determinación de la capacidad antioxidante del extracto

Para determinar la capacidad antioxidante del extracto etanólico se utilizó el método de atrapamiento del radical libre DPPH (2,2 difenil-1-hidracilo), el cual es estable y presenta una intensa coloración violeta que absorbe la longitud de onda de 517 nm (Antolovich *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2007). Los valores obtenidos fueron expresados en porcentaje de DPPH (Köhler *et al.*, 2007).

Se realiza el cálculo del porcentaje de inhibición, RSA, en base a la disminución de la concentración en

el tiempo considerando el valor de concentración inicial (Ley de Lambert-Beer) $RSA\% = [A_0 - A_c/A_0] \times 100$. Donde A_0 es la medición de absorbancia a tiempo 0, y A_c la absorbancia al tiempo final.

Determinación de polifenoles totales

Para la determinación de polifenoles totales se utilizó el método Folin-Ciocalteu (Waterman & Mole, 1994; Köhler *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos fueron expresados en equivalentes de ácido gálico (EGA) (Köhler *et al.*, 2007).

Determinación de clorofilas-a y b

Para la determinación de clorofilas-a y b, se usaron los mismos extractos utilizados en los análisis de DPPH y polifenoles totales. Previamente a las mediciones se calibró el equipo utilizando clorofila-a y b (Sigma). El cálculo del contenido de los pigmentos se realizó de acuerdo a las ecuaciones descritas por González *et al.* (2001):

$$\text{Clorofila-a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,96 * A_{665} - 6,88 * A_{649}$$

$$\text{Clorofila-b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = 24,96 * A_{649} - 7,32 * A_{665}$$

Determinación de la tasa de crecimiento

Se calculó en base a la fórmula:

$$\mu = [\ln(N_t) - \ln(N_0)] / \ln 2 (t - t_0)$$

donde: t: tiempo transcurrido entre el inicio y fin del prueba, t_0 : tiempo inicial, N_0 : densidad celular inicial, N_t : densidad celular final.

Análisis estadístico de los resultados

Mediante el programa computacional STATISTICA 7.0 los resultados obtenidos de DPPH, polifenoles totales y clorofilas, para los diferentes extractos, fueron sometidos al cumplimiento de los supuestos estadísticos (independencia, normalidad y homocedasticidad) necesarios para aplicar un ANOVA (análisis de varianza a una vía). Dado que los datos no cumplieron con todos los supuestos, se les aplicó el test no-paramétrico de Kruskal-Wallis, para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los extractos.

RESULTADOS

La etapa inicial de cultivo denominada también "1ª etapa", fue aquella donde por primera vez las microalgas fueron expuestas a radiación UV-B. En esta etapa los cultivos mantuvieron un comportamiento similar al control hasta el 5º día (inicio irradiación); sin embargo, posterior a este día se observó un marcado decaimiento en la densidad

celular de los cultivos expuestos (irradiados), en comparación el cultivo control (C) (Fig. 1). A partir del 5º día de cultivo, la densidad celular en los cultivos experimentales disminuyó en comparación al control con excepción de la 4ª etapa y al noveno día todos presentaron una disminución significativa en su densidad celular en comparación al cultivo control ($P < 0,05$) (Fig. 1).

La segunda fase experimental (2ª etapa), podría ser considerada como etapa intermedia o de transición, ya que, si bien los cultivos hasta el 5º día mantuvieron la misma tendencia que en la 1ª etapa, posteriormente los cultivos expuestos (irradiados) presentaron una estabilización en la densidad celular (Fig. 1). No obstante, la densidad máxima obtenida por el control fue superior al promedio obtenido por los experimentales, como se aclara en el comentario de la Tabla 1.

En la tercera fase experimental (3ª etapa), se observó un aumento en la densidad de los cultivos experimentales (irradiados) a la exposición de radiación UV-B, los cultivos nuevamente mantuvieron la misma tendencia hasta el 5º día y a partir del 6º día la densidad fue más baja que la del cultivo control, pero en ningún momento dejó de aumentar. La densidad celular de los cultivos aumentó lentamente con valores promedio de 2.033.333, 3.133.333 y 3.500.000 cel mL⁻¹ para los días 7, 8 y 9 respectivamente, pero siempre inferior al cultivo control que alcanzó densidades celulares de 3.343.750, 4.768.750 y 5.650.000 cel mL⁻¹ para los mismos días (Fig. 1).

En la Tabla 1, se observaron diferencias significativas tanto entre las etapas, como entre los días y la interacción de estos factores ($P < 0,000001$ para cada caso). En general, la prueba *a posteriori* mostró que entre las etapas, la 4ª y el control no difieren significativamente ($P = 0,297$). Sin embargo, sí existen diferencias significativas entre éstas y las etapas 1, 2 y 3 ($P < 0,0005$). El control mostró ser diferente a las etapas 1, 2 y 3, desde el día 5º de tratamiento al 9º ($P < 0,005$) y diferente a la etapa 4 solo el 9º día de exposición a RUV ($P = 0,007$). La 4ª etapa mostró diferencias significativas con las etapas 1, 2 y 3 desde el 5º al 8º día ($P < 0,0005$), observándose una caída en la densidad celular en el 9º día de tratamiento, lo que produjo que no existieran diferencias en ese día ($P = 0,357$) (Tabla 1).

La tasa de crecimiento muestra similar comportamiento que la densidad celular, con excepción del día 3 de tratamiento, donde se observaron diferencias significativas entre el control y las etapas 1, 2 y 3 ($P < 0,05$) (Tabla 2).

Los resultados de DPPH medidos en los extractos microalgales indicaron una leve capacidad antioxidante, obteniendo valores promedios de 0,9 a 5,6% (con

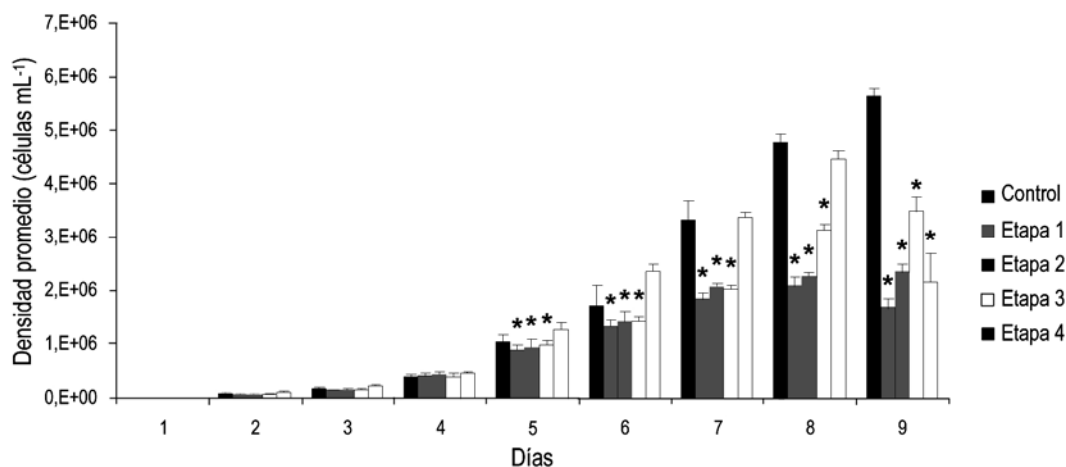


Figura 1. Biomasa celular control e irradiados, valores promedios \pm error estándar ($n = 3$) (inicio de irradiación a partir del día 5). * Diferencias significativas con respecto al control ($P < 0,05$).

Figure 1. Biomass curves (1 st stage of culture) and irradiated control cultures, mean values \pm standard error ($n = 3$) (irradiation was initiated from day 5). *Significant differences with respect to the control ($P < 0.05$).

Tabla 1. Resultados análisis de varianza ANOVA de dos vías para los datos de densidad celular por día y etapa de irradiación.

Table 1. Two-way ANOVA for the analysis of cellular biomass data for day and stage of irradiation.

	SS	gl	MS	F	P
Etapa + Día	2,66E + 14	1	2,66E + 14	702,583	0,00000
Etapa	1,91E + 13	4	4,77E + 12	12,602	0,00000
Día	2,44E + 14	8	3,05E + 13	80,635	0,00000
Error	4,96E + 13	131	3,79E + 11		

Tabla 2. Resultados análisis de varianza ANOVA de dos vías para los datos de crecimiento celular por día y etapa de irradiación.

Table 2. Two-way ANOVA for the analysis of data cell growth for day and stage of irradiation.

	SS	gl	MS	F	P
Etapa + Día	3,208211	1	3,208211	1861,152	0,000000
Etapa	0,107042	4	0,026761	15,524	0,000000
Día	1,697337	8	0,212167	123,083	0,000000
Error	0,225815	131	0,001724		

sumo de DPPH), siendo los más altos 3,9; 5,3 y 5,7%, para los extractos “C” (Control), “IV(b)” y “IV(a)” (cultivos irradiados) respectivamente (Fig. 3).

Los resultados de “polifenoles totales” obtenidos de los extractos microalgales van desde 0,12 a 0,39 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de células, siendo los valores más altos 0,25; 0,27; 0,30; y 0,39 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de células para los extractos “C” (Control) “IV(b)”, “III” y “IV(a)” (cultivos irradiados) respectivamente (Fig. 4).

Los resultados obtenidos en ambas clorofilas-*a* y *b* presentan tendencias muy similares presentando una alta correlación ($R^2 = 0,92$) estadísticamente significativa ($P < 0,05$). El efecto negativo de la radiación UV-B se observó al final de la primera fase de irradiación, disminuyendo ambos tipos de clorofilas. Sin embargo, a partir de la segunda fase (Etapa 2) las concentraciones tanto de clorofila-*a* como *b* comenzaron a aumentar hasta llegar a un nivel máximo

alcanzado en la cuarta fase (extracto IV(b)), inmediatamente después de ésta los extractos no presentaron diferencias significativas (Figs. 5 y 6).

DISCUSIÓN

La dosis de radiación utilizada es similar a la utilizada en otros ensayos con distintas especies (Duval *et al.*, 2000; Estévez *et al.*, 2001; Vimalabai & Kulandaivelu, 2002; Wong *et al.*, 2007), en ensayos previos se determinó la dosis que no produjera una eliminación importante de microalgas.

Las respuestas de las microalgas (irradiadas) frente a la radiación UV-B determinadas en las distintas fases de cultivo pueden ser clasificadas en dos grupos. La primera comprende la 1ª y 4ª etapa, donde hay un efecto negativo sobre las microalgas, reflejado en la baja de la densidad y crecimiento celular a partir del octavo día. En estudios similares se ha atribuido dicho efecto a daño a proteínas y ADN, efecto descrito por Xiong (2001), inhibición en la absorción de nutrientes (Guan, 2008) y la inhibición fotosintética (Aguilera *et al.*, 2008). Sin embargo en la 3ª etapa la densidad y el crecimiento celular se recuperaron después de la 1ª y 2ª etapa indicando que las microalgas lograron alcanzar una “respuesta adaptativa”. Este acondicionamiento ha sido descrito por otros autores como un mecanismo de sobrevivencia. Helbling *et al.* (1992) indican que el fitoplancton de bajas latitudes no exhibe una disminución en la capacidad fotosintética frente a los altos niveles de radiación UV a que está expuesto, dando lugar a la hipótesis de que estaría adaptado evolutivamente en comparación al fitoplancton de zonas polares.

Algunos autores indican que las microalgas muestran tasas de crecimiento mayores frente a la radiación UV-B (Vimalabai & Kulandaivelu, 2002), mientras que otros autores indican que la fotoadaptación de las microalgas se puede conseguir inclusive en menos de 24 h (Prezelin & Matlik, 1980). Estudios recientes (Wong *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2011) señalan que la sensibilidad de las microalgas a la RUV-B, es especie-específica y depende de la región biogeográfica. En el primer trabajo se compararon nueve microalgas, *Chlorella* antártica fue la más tolerante a la radiación, lo que resultó sorprendente, puesto que se esperaba que la *Chlorella* tropical fuese más adaptada a altos niveles de radiación en los trópicos, que la especie antártica. Una posible explicación sería su eficiencia para defenderse de los radicales libres a través de la producción de antioxidantes, tales como α -tocoferol, β -caroteno y tioles como lo señala por Estevez *et al.* (2001). El

Guan *et al.*, (2008) muestran que *C. curvisetus* es sensible a la RUV pero es capaz de aclimatare rápidamente (aprox. seis días), sintetizando compuestos que absorben la radiación UV y aumentando la velocidad de procesos de reparación de proteína D1 en el PSII. En nuestro caso, la producción de polifenoles y el aumento de la capacidad antioxidante de *Chlorella* sp., sería la respuesta al estrés oxidativo inducido por RUV-B.

Los valores de capacidad antioxidante total, medidos por el método DPPH, podrían ser considerados bajos comparados con los obtenidos por otros autores en diversas algas. Vidal *et al.* (2006), determinaron en extractos acuosos de *Bryothamnion triquetrum* porcentajes de consumo de DPPH del 50%. Yan *et al.* (1998), en un screening realizado en 27 algas determinaron valores que van desde 69% hasta 90% en *Desmarestia viridis*, 755% en *Polysiphonia urceolata*, 83% en *Rhodomela teres* y 87% en *Gelidium amansii*, lo que concuerda con que la respuesta es especie-dependiente. La misma explicación es válida para los resultados de fenoles totales que son relativamente más bajos que los obtenidos por Duval *et al.* (2000) para *Chlamydomona nivalis*, que fluctuaron entre 0,5 y 0,8 $\mu\text{g mg}^{-1}$ de células.

Aunque los niveles obtenidos de DPPH y polifenoles totales fueron relativamente bajos, se pudo apreciar una recuperación durante el transcurso del experimento. Sin embargo, a pesar que presentaron entre ambos una correlación alta ($R^2 = 0,73$), ésta no fue significativa ($P > 0,05$). El método DPPH evalúa capacidad antioxidante de cualquier compuesto capaz de atrapar radicales libres, no solamente compuestos fenólicos, lo que podría explicar que la correlación no fue significativa. En las primeras horas de exposición al factor estresante (RUV-B), las microalgas mostraron un efecto negativo, disminuyendo densidad, crecimiento celular, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos (Figs. 1 a 4). Sin embargo, a partir de la segunda etapa, los cultivos comenzaron a mostrar una aclimatación a la irradiación, aunque los valores de densidad-crecimiento celular, capacidad antioxidante y compuestos fenólicos fueron más bajos que el cultivo control, éstos comenzaron a mostrar una tendencia al alza (Figs. 1 a 4). La tendencia mostrada en la 2ª etapa del cultivo se mantuvo en la 3ª y 4ª hasta llegar a un punto crítico, donde los efectos negativos sobrepasaron la capacidad de respuesta, observándose una considerable disminución en los factores medidos (Figs. 1 y 2). Havelková-Dousová *et al.* (2004) estudiaron la aclimatación de *D. tertiolecta*, a regímenes de irradiancia simulando condiciones de turbidez de aguas estuarinas o lagos, encontrando que los mecanismos operan a escalas cortas de tiempo

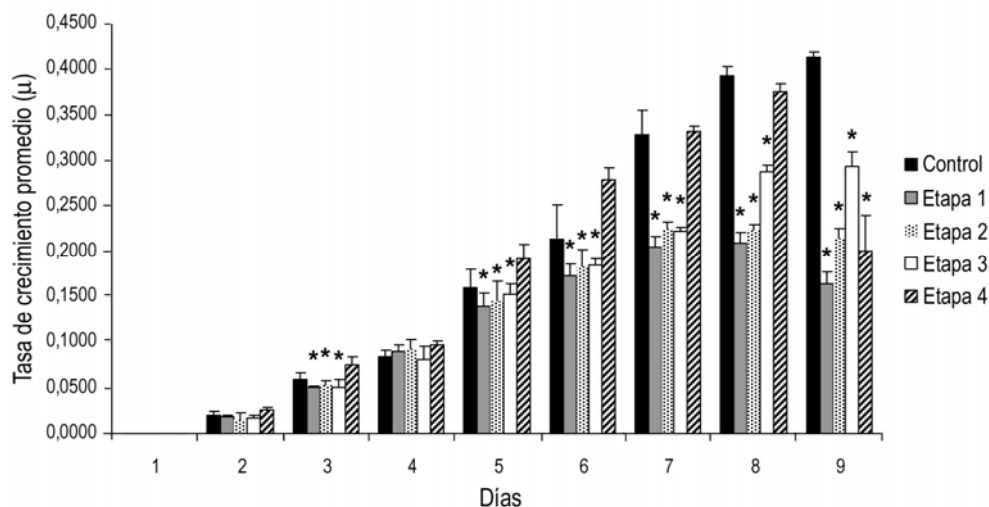


Figura 2. Comparación entre la tasa de crecimiento promedio (μ) entre control e irradiados, y los tratamientos en el tiempo valores promedios \pm desviación estándar ($n = 3$) (inicio de irradiación a partir día 5). *Diferencias significativas con respecto al control ($P < 0,05$)

Figure 2. Average growth rate (μ) (control and irradiated, mean values \pm standard deviation ($n = 3$)) (start of irradiation from day 5). * Significant differences with respect to the control ($P < 0.05$).

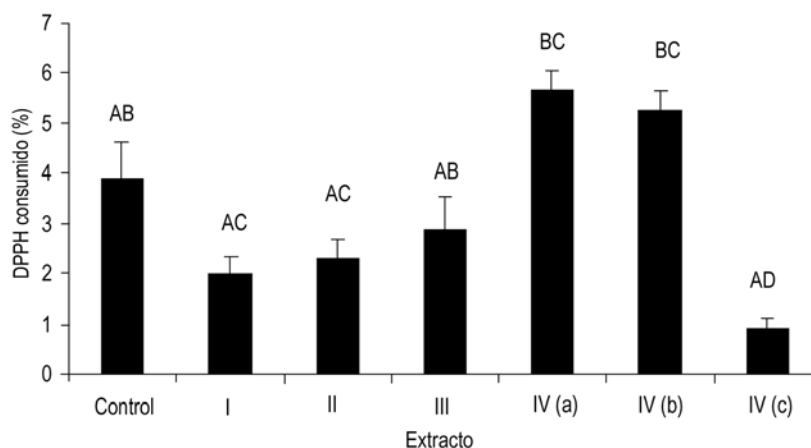


Figura 3. Respuesta de *Chlorella* sp. (extractos etanólicos) a los diferentes ciclos de irradiación UV-B. Capacidad antioxidante medida como consumo del radical DPPH, barras correspondientes al promedio \pm error estándar ($n = 6$, $P = 0,0001$). Letras distintas indican diferencias significativas.

Figure 3. *Chlorella* sp. (ethanolic extract) response at different cycles of UV-B radiation. Antioxidant capacity measured as DPPH radical consumption, bars corresponding to mean \pm standard error ($n = 6$, $P = 0.0001$). Different letters indicate significant differences.

manteniendo la capacidad de disipación no fotoquímica de la energía, que no interfiere con la síntesis de pigmentos. Bhandari & Sharma (2011) evaluaron el efecto de la RUV-B y RUV-B suplementada con luz PAR de baja intensidad sobre la fotosíntesis, pigmentos fotosintéticos, fosfolípidos, daño oxidativo, enzimas antioxidantes y compuestos filtros de RUV-B en la microalga *Phormidium tenue*, encontrando que la fotosíntesis fue

afectada y que el principal sistema protector fue la síntesis de aminoácidos tipo micospolina y compuestos tipo escitonemina, más que enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa.

La respuesta de las microalgas que se apreció durante el experimento puede ser asociada a un fenómeno llamado "Hormesis", que se define como la relación entre dosis y la respuesta, caracterizada por estimulación a bajas dosis e inhibición a altas dosis.

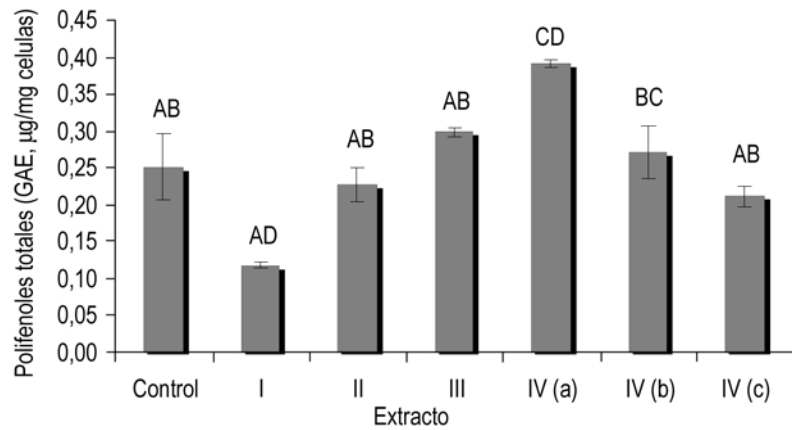


Figura 4. Respuesta de *Chlorella* sp. (extractos etanólicos) a los diferentes ciclos de irradiación UV-B. Polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico, barras correspondientes al promedio \pm error estándar ($n = 6$; $P = 0,00001$). Letras distintas indican diferencias significativas.

Figure 4. *Chlorella* sp. (ethanolic extract) response at different cycles of UV-B radiation. Total polyphenols expressed as gallic acid equivalent, bars corresponding to mean \pm standard error ($n = 6$, $P = 0.00001$). Different letters indicate significant differences.

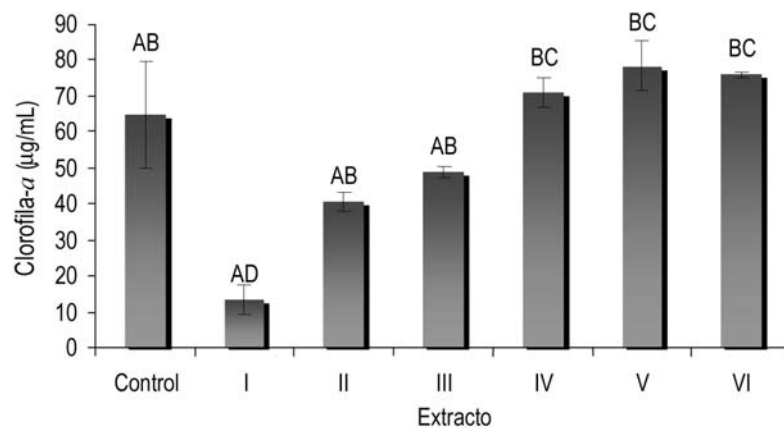


Figura 5. Respuesta de *Chlorella* sp. (extractos etanólicos) a los diferentes ciclos de irradiación UV-B. Cuantificación de clorofila-a expresada en $\mu\text{g mL}^{-1}$, barras correspondientes al promedio \pm error estándar ($n = 6$, $P = 0,0001$). Letras distintas indican diferencias significativas.

Figure 5. *Chlorella* sp. (ethanolic extract) response at different cycles of UV-B radiation. Chlorophyll-a quantification expressed as micrograms $\mu\text{g mL}^{-1}$, bars corresponding to mean \pm standard error ($n = 6$, $P = 0.0001$). Different letters indicate significant differences.

Cuando los niveles de irradiancia son bajos o cuando la velocidad de mezcla, dentro de la capa superior de mezcla, es relativamente rápida, las longitudes mayores de la RUV pueden favorecer la fotosíntesis en el fitoplancton (Barbieri *et al.*, 2002; Helbling *et al.*, 2003). Aunque en este trabajo no se midió la fotosíntesis, el hecho que a partir de la 2ª etapa las concentraciones tanto de clorofila-a como b comenzaron a aumentar hasta llegar a un nivel máximo en la 4ª etapa, sería indicativo de un aumento de la fotosíntesis. Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes para los vegetales, de

ahí es la necesidad y prioridad de ser protegidos por estos organismos. Dentro de los mecanismos descritos para evitar o disminuir el daño por exceso de energía, se encuentran aquellos que disipan este exceso de energía. Dodd *et al.* (1998) describieron a los antocianos (polifenoles) como compuestos “pantalla” que reducirían la cantidad de luz absorbida por las clorofilas. García-Pichell (1994) propuso un modelo teórico para evaluar el efecto de materiales celulares en la eficiencia de los compuestos que actúan como pantallas solares (fenómeno conocido como “autosombreado” o self-shading), y que es depen-

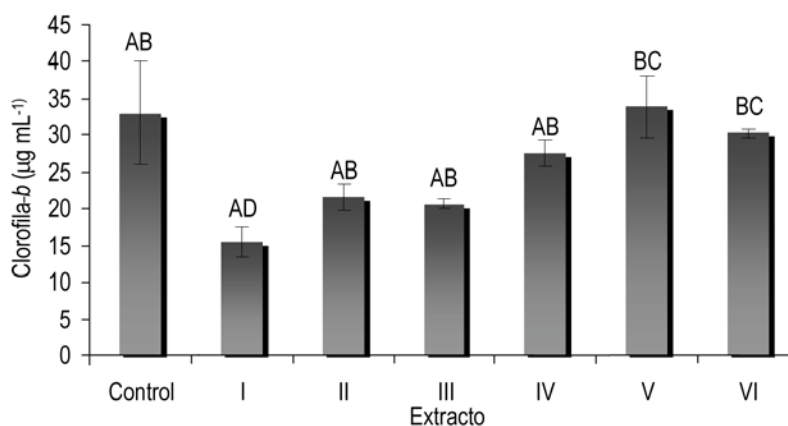


Figura 6. Respuesta de *Chlorella* sp (extractos etanólicos) a los diferentes ciclos de irradiación UV-B. Polifenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico, barras correspondientes al promedio \pm error estándar ($n = 6$; $P = 0,00001$). Letras distintas indican diferencias significativas.

Figure 6 . *Chlorella* sp (ethanolic extract) response at different cycles of UV-B radiation. Total polyphenols expressed as gallic acid equivalent, bars corresponding to mean \pm standard error ($n = 6$, $P = 0.00001$). Different letters indicate significant differences.

diente del tamaño y forma del organismo. Considerando que el alga utilizada en este estudio tiene un tamaño entre 2 y 6 μm , clasificada como nanoplacton, este efecto podría estar presente y explicar la baja producción de compuestos fenólicos debido a la amortización en la intensidad de la RUV incidente debido a la elevada biomasa fitoplanctónica, por tanto, la baja producción no implicaría ineficiencia en el mecanismo de protección. El aumento en la producción de polifenoles totales a partir del extracto "II" conduciría a un aumento de las clorofilas, ya que habrían actuado como pantalla absorbiendo el exceso de energía lumínica. La densidad celular se observa muy afectada en la 4ª etapa (muestra de la cual se obtuvo el extracto IV(c), luego de tres días consecutivos de 1 h de exposición a la RUV-B (Fig. 1). Sin embargo, este resultado no concuerda con los valores de clorofila-*a* y *b* donde los valores no disminuyen significativamente al compararlos con la 4ª etapa (muestra de la cual se obtuvo el extracto IV(b) (Figs. 5 y 6). Esto sugiere un mecanismo compensatorio aumentando la producción de clorofila por muerte celular.

Estos resultados podrían atribuirse a que la RUV podría afectar de diferente manera los dos principales blancos (la molécula de ADN y los fotosistemas), como fue sugerido en estudios desarrollados por Buma *et al.* (2001) y Helbling *et al.* (2001) en ecosistemas acuáticos templados.

El daño generado por la radiación UV sobre los organismos marinos ha sido documentado desde las primeras investigaciones marinas que se han llevado a cabo (Stemann, 1964). Estos organismos han desarrollado una serie de respuestas fotoprotectoras para

evitar o disminuir al máximo este daño (Wong *et al.*, 2007). En el caso que se haya generado daño, existen mecanismos encargados de repararlo. Asociado a esta capacidad reparadora está el rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) (Neale *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2011). Dicho fotosistema es el principal dañado por dosis elevadas de radiación y es de gran importancia pues en él se inicia el proceso de fotosíntesis. Cuando este factor logra el equilibrio indica que existe una fotoadaptación del sistema, lo cual explicaría la disminución significativa tanto en la clorofila-*a* como *b*, después del máximo observado en la 4ª etapa, extracto IV(b) (Figs. 5 y 6).

Finalmente, con dosis UV-B controladas, consecutivas y ascendentes en el tiempo, es posible lograr una respuesta en la microalga *Chlorella* sp. expresada en los niveles de fenoles totales alcanzados en la 4ª etapa de cultivo irradiado que superó significativamente a los alcanzados por el cultivo control, lo que constituye un mecanismo de protección en estos organismos.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Ficología, Facultad de Ciencias del Mar y Recursos Naturales de la Universidad de Valparaíso, que facilitaron los cultivos del *Chlorella* sp.

REFERENCIAS

- Aguilera, J., F. Figueroa, D. Häder & C. Jiménez. 2008. Photoinhibition and photosynthetic pigment reorganization dynamics in light/darkness cycles as photopro

- tective mechanisms of *Porphyra umbilicalis* against damaging effects of UV radiation. *Sci. Mar.*, 72(1): 87-97.
- Antolovich, M., P. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald & K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198.
- Bhandari, R. & P.K. Sharma. 2011. Photosynthetic and biochemical characterization of pigments and UV-absorbing compounds in *Phormidium tenue* due to UV-B radiation. *J. Appl. Phycol.*, 23: 283-292.
- Barbieri, E., V.E. Villafañe & E.W. Helbling. 2002. Experimental assessment of UV effects on temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol. Oceanogr.*, 47(6): 1648-1655.
- Björn, L. 2007. *The science of life and light*. Springer, Lund, 684 pp.
- Bouchard, J.N., D.A. Campbell & S. Roy. 2005. Effects of UV-B radiation on the D1 protein repair cycle of natural phytoplankton communities from three latitudes (Canada, Brazil and Argentina). *J. Phycol.*, 41: 273-286.
- Buma, A.G.J., E.W. Helbling, M.K. de Boer & V.E. Villafañe. 2001. DNA damage patterns in temperate South-Atlantic picophytoplankton assemblages exposed to solar ultraviolet radiation. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 62: 9-18.
- Cantos, E., C. García, S. Pascual & F. Tomás. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on Resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *J. Agr. Food Chem.*, 48(10): 4606-4612.
- Cockell, C. & J. Knowland. 1999. Ultraviolet screening compounds. *Biol. Rev.*, 74: 311-345.
- Dodd, I., C. Chritchley, G. Woodall & G. Stewart. 1998. Photoinhibition in differently colored juvenile leaves of *Syzygium* species. *J. Exp. Bot.*, 49(325): 1437-1445.
- Duval, B., K. Shetty & W. Thomas. 2000. Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.*, 11: 559-566.
- Estevez, M., G. Malanga & S. Puntarulo. 2001. UV-B effects on Antarctic *Chlorella* sp. cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 62: 19-25.
- Finkel, T. & N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 407: 239-408.
- García-Pichel, F., N.D. Sherry & R.W. Castenholz. 1992. Evidence for an ultraviolet sunscreen role of the extracellular pigment scytonemin in the terrestrial cyanobacterium *Chlorogloeopsis* sp. *Photochem. Photobiol.*, 56: 17-23.
- García-Pichel, F. 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.*, 39: 1704-1717.
- Gómez, I., E. Pérez-Rodríguez, B. Viñegla, F.L. Figueroa & U. Karsten. 1998. Effects of solar radiation on photosynthesis, UV-absorbing compounds and enzyme activities of the green alga *Dasycladus vermicularis* form southern Spain. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 47: 46-57.
- González, J., C. Pastenes & P. Horton. 2001. Effect of temperature, water and light stress on PSII heterogeneity in four bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 74: 779-791.
- Guan, W. & K. Gao. 2008. Light histories influence the impacts of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and growth in a marine diatom, *Skeletonema costatum*. *Photochem. Photobiol. B.*, 91:151-156.
- Guan, W.C., P. Li, J.B. Jian, J.Y. Wang & S.H. Lu. 2011. Effects of solar ultraviolet radiation on photochemical efficiency of *Chaetoceros curvisetus* (Bacillariophyceae). *Acta Physiol Plant.*, 33: 979-986.
- Hader, D., H. Kumar, R. Smith & R. Worrest. 1998. Effects on aquatic ecosystems, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 46: 53-68.
- Hargreaves, B.R. 2003. Water column optics and penetration of UVR. In: E.W. Helbling & H.E. Zagarese (eds.). *UV effects in aquatic organisms and ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 59-105.
- Havelková-Dousová, H., O. Prásil & M.J. Behrenfeld. 2004. Photoacclimation of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) under fluctuating irradiance. *Photosynthetica*, 42(2): 273-281.
- Helbling, E., V. Villafañe, M. Ferrario & O. Holm-Hansen. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 80: 89-100.
- Helbling, E.W., A.G.J. Buma, M.K. de Boer & V.E. Villafañe. 2001. *In situ* impact of solar ultraviolet radiation on photosynthesis and DNA in temperate marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 211: 43-49.
- Helbling, E.W., K. Gao, R.J. Goncalves, H. Wu & V.E. Villafañe. 2003. Utilization of solar ultraviolet radiation by phytoplankton assemblages from the southern China Sea when exposed to fast mixing conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 259: 59-66.
- Hernando, M., G. Malanga & G.A. Ferreyra. 2005. Oxidative stress and antioxidant defenses due UV radiation in sub-antarctic marine phytoplankton. *Sci. Mar.*, 69 (Suppl. 2): 287-295.

- Hernando, M., I. Schloss, S. Roy & G. Ferreyra. 2006. Photoacclimation to long-term UVR exposure of natural Sub-Antarctic phytoplankton communities: fixed surface incubations versus mixed mesocosms. *Photochem. Photobiol. B.*, 82: 923-935.
- Hoyer, K., U. Karsten, T. Sawall & C. Wiencke. 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and development stages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 211: 117-129.
- Hughes, K. 2006. Solar UV-B radiation, associated with ozone depletion, inhibits the Antarctic terrestrial microalga, *Stichococcus bacillaris*. *Polar Biol.*, 29: 327-336.
- Janknegt, P.J., C.M. de Graaff, W.H. van de Poll, R.J. W. Visser, E.W. Helbling & A.G.J. Buma. 2009. Antioxidative responses of two marine microalgae during acclimation to static and fluctuating natural UV radiation. *Photochem Photobiol.*, 85: 6 pp.
- Karentz, D., J. Cleaver & D. Mitchel. 1991. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.*, 27: 326-341.
- Köhler, H., R. Contreras & G. Zúñiga. 2007. Study of antioxidant capacity of organic extracts of *Ugni molinae Turcz.* leaves. *Biol. Res.*, 40: 124 pp.
- Kuskoski, M., A. Asuero, C. García, A. Troncoso & R. Fett. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Cienc. Tecnol. Alim.*, 24(4): 691-693.
- Malanga, G., G. Calmanovici & S. Puntarulo. 1997. Oxidative damage to chloroplasts from *Chlorella vulgaris* exposed to ultraviolet-B radiation. *Physiol. Plant.*, 101: 455-462.
- Moskaug, J., H. Carlsen, M. Myhrstad & R. Blomhoff. 2005. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 277-283.
- Neale, P. 2000. Spectral weighting functions for quantifying the effects of ultraviolet radiation in marine ecosystems, In: S. De Mora, S. Demers & M. Vernet (eds.). *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 73-100.
- Pavia, H., G. Cervin, A. Lindgren & P. Aberg. 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivore on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 157: 139-146.
- Prezelin, B. & H. Matlick. 1980. Time course of photoadaptation in the photosynthesis irradiance relationship of a dinoflagellate exhibiting photosynthetic periodicity. *Mar. Biol.*, 58: 85-96.
- Reuber, S., J. Bornman & G. Weissenbock. 1996. A flavonoid mutant of barley (*Hordeum vulgare* L.) exhibits increased sensitivity of UV-B radiation in the primary leaf. *Plant. Cell. Environ.*, 19: 593-601.
- Rozema, J., L. Björn, J. Bornman, A. Gaberscik, D. Häder, T. Trost, M. Germ, M. Klisch, A. Gröniger, R. Sinha, M. Lebert, R. Buffoni-Hall, N. de Bakker, J. van de Staaij & B. Meijkamp. 2002. The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems - an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 66: 2-12.
- Scalbert, A. & G. Williamson. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols, *J. Nutr.*, 130: 2073-2085.
- Shelly, K., S. Roberts, P. Heraud & J. Beardall. 2006. Interactions between UV-B exposure and phosphorus nutrition. I. Effects on growth, phosphate uptake, and chlorophyll fluorescence. *J. Phycol.*, 41: 1204-1211.
- Shiu, C. & T. Lee. 2005. Ultraviolet-B-induced oxidative stress and responses of the ascorbate-glutathione cycle in a marine macroalga *Ulva fasciata*. *J. Exp. Bot.*, 421(56): 2851-2865.
- Stemann, E. 1964. On a complication in marine productivity work due to the influence of ultraviolet light. *J. Cons. Inter. Explor. Mer.*, 22: 130-135.
- Tevini, M. 1993. Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plants. In: M. Tevini (ed.). *UV-B radiation and ozone depletion: effects on humans, animals, plants, microorganisms, and materials*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 125-153.
- Vidal, A., A. Fallarero, E. Silva de Andrade-Wartha, A. de Oliveira e Silva, A. de Lima, R. Torres, P. Vuirela & J. Mancini-Filho. 2006. Composición química y actividad antioxidante del alga marina roja *Bryothamnion triquetrum* (S.G. Gmelim) Howe. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 42(4): 589-600.
- Vimalabai, C. & G. Kulandaivelu. 2002. Effects of prolonged UV-B enhanced fluorescent radiation on some marine microalgae. *Biol. Plantarum*, 45(3): 389-394.
- Waterman, P. & S. Mole. 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 336.
- Wong, C.Y., W.L. Chu, H. Marchant & S.M. Phang. 2007. Comparing the response of Antarctic, tropical and temperate microalgae to ultraviolet radiation (UVR) stress. *J. Appl. Phycol.*, 19: 689-699.
- Yan, X., T. Nagata & X. Fan. 1998. Antioxidative activities in some common seaweeds. *Plant. Food. Hum. Nutr.*, 52: 253-262.
- Zudaire, L. & S. Roy. 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 62: 26-34.