

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA SECUENCIA PROTEICA  
DE CHLOROPHYTAS FILAMENTOSAS EN LA CUENCA DEL RIO  
QUESERMAYO - DISTRITO DE TARAY - CALCA – CUSCO”**

**TESIS PRESENTADA POR:**

**Bach. ALAIN FERNANDO ORELLANO TUERO**

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**Asesora:**

**Dra. MARÍA ENCARNACIÓN HOLGADO ROJAS**

**Co-Asesor**

**Ph. D. LUIS ALBERTO PONCE SOTO**

**CUSCO – PERÚ**

**2019**

*A mi familia, en especial a mis tres hijos Ale, Mafer, Pablito, mi madrecita Urlanda mi Mamá Panchita (Q.E.P.D.) y mis suegros los cuales son un gran apoyo y fortaleza dentro de mi vida profesional.*

*Sobre todo, a mi esposa Nelly por su Amor incondicional y entusiasmo en todo lo que hago.*

*A mis amigos, por su apoyo constante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A Dios Padre quien vela por el bienestar mío, el de mi Familia y personas que me rodean día a día.*

*A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, que fue mi segundo hogar por muchos años, velando por mi vida profesional.*

*A mi asesora, la Dra. Maria Encarnación Holgado Rojas, quien tuvo la sensatez y paciencia necesaria para que el presente trabajo se lleve a cabo con mucho éxito.*

*A mi Co asesor, Ph. D. Luis Alberto Ponce soto, quien dio todo su esfuerzo y tiempo necesario para concluir el presente trabajo con mucho éxito.*

*A mi familia en general por todo su apoyo y cariño, sobre todo a mi Tía Evelia por su interés en desarrollar mi vida profesional.*

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA SECUENCIA PROTEICA DE  
CHLOROPHYTAS FILAMENTOSAS EN LA CUENCA DEL RIO  
QUESERMAYO - DISTRITO DE TARAY - CALCA – CUSCO”**

**SUMARIO**

RESUMEN	i
INTRODUCCION	ii
PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACION	iii
OBJETIVOS	iv
JUSTIFICACION	v
HIPOTESIS	vi

**CAPITULO I**

**GENERALIDADES**

<b>1.1 ANTECEDENTES</b> .....	1
<b>1.2 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL</b> .....	3
1.2.1 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN CAVALIER-SMITH (1981). DOMINIOS, REINOS Y GRUPOS ALGALES MÁS REPRESENTATIVOS. ....	3
1.2.2 ALGAS .....	5
1.2.3 Importancia económica de las algas macroscópicas .....	11
1.2.4 Propiedades Nutricionales de las Algas.....	12
1.2.5 Clasificación de las Algas .....	13
1.2.6 Aplicaciones biotecnológicas.....	15
1.2.7 Taxonomía y distribución de las cladophorales .....	15
<b>1.3 Proteómica Funcional</b> .....	18
1.3.1 Tecnología de la Proteómica .....	20

1.3.2	Separación de Proteínas .....	21
1.3.3	Identificación y Caracterización de Proteínas .....	23

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

<b>2.1</b>	<b>AREA DE ESTUDIO .....</b>	<b>26</b>
2.1.1	ACCESIBILIDAD .....	26
2.1.2	UBICACIÓN GEOGRAFICA .....	26
2.1.3	CENTROS POBLADOS .....	31
2.1.4	GEOMORFOLOGIA .....	32
2.1.5	GEOLOGIA .....	32
2.1.6	REGIONES NATURALES .....	33
2.1.7	ZONAS DE VIDA.....	34
2.1.8	CLIMA .....	34
2.1.9	PRINCIPALES RECURSOS NATURALES.....	35
2.1.10	POTENCIALIDADES DEL DISTRITO .....	41
2.1.11	LIMITACIONES .....	41
<b>2.2</b>	<b>MATERIALES .....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Material biológico.....	44
2.2.2	Materiales y equipos de campo: .....	44
2.2.3	Materiales y Equipos de gabinete .....	45
<b>2.3</b>	<b>METODOS .....</b>	<b>47</b>
2.3.1	De la determinación Taxonómica de las especies de Chlorophytas filamentosas de importancia económica en la Cuenca del río...Quesermayo.....	48

2.3.2 De la purificación de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de cromatografía líquida, usando minicolumnas HiTRAP de interacción hidrofóbica .....	49
2.3.3 De la determinación de la masa molecular de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de la electroforesis de proteínas e presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	51
2.3.4 De la determinación de la secuencia de "novo" de las proteínas expresas a través de espectrometría de masas (Electrospray ESI y MALDI tof/tof) .....	54

### CAPITULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>3.1 De la determinación Taxonómica de las especies de Chlorophytas filamentosas de importancia económica en la Cuenca de Quesermayo .....</b>	<b>55</b>
3.1.1 OBSERVACION MACROSCÓPICA .....	55
3.1.2 OBSERVACION MICROSCOPICA .....	56
<b>3.2 De la purificación de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de cromatografía líquida, usando minicolumnas HiTRAP de interacción hidrofóbica .....</b>	<b>59</b>
3.2.1 Determinación de proteína (Metodo de Biuret) .....	59
3.2.2 Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en minicolumnas HiTRAP.....	59
<b>3.3 De la determinación de la masa molecular de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de la electroforesis de proteínas e presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....</b>	<b>60</b>
3.3.1 Electroforesis en SDS - PAGE.....	60

3.3.2	Determinacion de la masa molecular relativa .....	61
3.3.3	Analisis de Composicion de Aminoácidos (Sistema Pico - Tag) .....	62
3.3.4	Estudio de Homología Secuencial .....	63
<b>3.4</b>	<b>Del estudio Bioinformático de las proteínas secuenciadas para establecer su nivel de homología secuencial .....</b>	<b>64</b>
3.4.1	Caracterización de la estructura primaria de "novo" por espectrometría de masa MS/MS - PICO 1 .....	64
3.4.2	Caracterización de la estructura primaria de "novo" por espectrometría de masa MS/MS - PICO 2 .....	67
3.4.3	Caracterización de la estructura primaria de "novo" por espectrometría de masa MS/MS - PICO 3 .....	70
3.4.4	Caracterización de la estructura primaria de "novo" por espectrometría de masa MS/MS - PICO 4 .....	73
3.4.5	Caracterización de la estructura primaria de "novo" por espectrometría de masa MS/MS - PICO 5 .....	76
DISCUSIÓN .....		80
CONCLUSIONES .....		82
RECOMENDACIONES .....		83
BIBLIOGRAFÍA .....		84
ANEXOS .....		88

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ramificación Pseudodicotómica de Cladophora.....	17
Figura 2. Ramificación Pseudodicotómica de Cladophora.....	17
Figura 3. Cladophora: Gametófito y Esporófito.....	18
Figura 4. Cuenca de Quesermayo.....	30
Figura 5. Rio Quesermayo .....	49
Figura 6. Observación macroscópica .....	57
Figura 7. Observación macroscópica .....	57
Figura 8. Observación macroscópica .....	57
Figura 9. Observación de muestra en 4x .....	58
Figura 10. Observación de muestra en 10x .....	58
Figura 11. Observación de muestra en 40x .....	58
Figura 12. Cladophora glomerata .....	59
Figura 13. Cladophora glomerata .....	59
Figura 14. Cladophora glomerata .....	59
Figura 15. Picos de la Cromatografía de interacción hidrofóbica .....	61
Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida .....	62
Figura 17. Determinación de la masa molecular relativa .....	62
Figura 18. Masa real del ion crucial de la proteína 1.....	66
Figura 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos Pico 1.....	67
Figura 20. Masa real del ion crucial de la proteína 2.....	69
Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos Pico 2 .....	70
Figura 22. Masa real del ion crucial de la proteína 3.....	72
Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos Pico 3 .....	73
Figura 24. Masa real del ion crucial de la proteína 4.....	75
Figura 25. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos Pico 4 .....	76
Figura 26. Masa real del ion crucial de la proteína 5.....	78
Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos Pico 5 .....	79

## INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Centros Poblados del Distrito de Taray.
- Cuadro 2. Formaciones geológicas del distrito de Taray
- Cuadro 3. Regiones Naturales del Distrito de Taray.
- Cuadro 4. Zonas de Vida del Distrito de Taray.
- Cuadro 5. Especies arbóreas por comunidad.
- Cuadro 6. Disponibilidad del recurso hídrico
- Cuadro 7. Síntesis de la situación actual de los Recursos naturales del Distrito de Taray.
- Cuadro 8. Valores de la determinación de la curva estándar de proteínas.
- Cuadro 9. Análisis de Composición Global de Aminoácidos de las fracciones proteicas purificadas a partir de Chlorophytas filamentosas, evidenciando el carácter de cada una de ellas
- Cuadro 10. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrolisis trípica a partir de la proteína 1 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.
- Cuadro 11. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrolisis trípica a partir de la proteína 2 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.
- Cuadro 12. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrolisis trípica a partir de la proteína 2 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.
- Cuadro 13. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrolisis trípica a partir de la proteína 4 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.

Cuadro 14. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis trípica a partir de la proteína 4 de la *Chlorophytas* filamentosa. La metionina fue modificada por oxidación.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de investigación y producción de hongos alimenticios y medicinales CIPHAM de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, los laboratorios de Bioinformática de la Universidad San Agustín de Arequipa y el Laboratorio de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad estatal de Campinas en Brasil.

El área de estudio es la cuenca del Rio Quesermayo - Distrito De Taray -Calca – Cusco. Las recolecciones de las muestras se realizaron durante los meses de junio y julio, temporadas donde encontramos en mayor cantidad algas verdes filamentosas, a los cuales se realizaron muestreos de forma masiva.

La determinación taxonómica se realizó mediante la toma de muestra en la zona de estudio al cual se le realizaron análisis macroscópicos y microscópicos utilizando claves dicotómicas y consulta a especialistas, y demás recopilación bibliográfica constatando las características morfológicas; se determinó que la especie de Chlorophyta filamentosas existente en mayor cantidad, pertenece a la familia Cladophoraceae, genero Cladophora y especie *Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützing Seattle, conocida en la zona con el nombre común de Mayulaq'o, llask'a, cabellos de venus.

Una vez determinada la especie, se procedió a demostrar la presencia de proteínas para determinar si podrían ser de importancia alimenticia - medicinal y realizar los respectivos análisis de las propiedades nutritivas a través de una plataforma de Aproximación Proteómica, purificando las proteínas expresas mediante cromatografía líquida, usando minicolumnas de interacción Hidrofóbica, desde la obtención del extracto crudo, determinación de la curva estándar de proteínas, al cual se utilizó la Bovine Serum Albumine – BSA (proteína estándar extraída del suero bovino que es ampliamente usada en muchos procedimientos bioquímicos), obteniendo el factor de calibración igual a 19.485, el cual es utilizado para hallar la concentración de proteína de la

muestra problema, dando como resultado una cantidad de 12 mg por ml de muestra; demostrando así un resultado favorable para el estudio en cuestión.

Posteriormente se realizó la Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en minicolumnas HiTRAP, donde se reveló la presencia de 7 picos, de los cuales se tomaron interés en los picos con mayor elevación (5), siendo el pico 5 aquel que mostró mayor concentración de proteínas de la muestra, necesarias para hallar la masa molecular de las proteínas expresas a través de electroforesis de proteínas en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS – PAGE) de las fracciones 1, 2, 3, 4, y 5 purificadas las cuales evidenciaron una masa molecular relativa de 15 kDa (pico4), 22 kDa (pico 5), 30 kDa (pico 3), 48 kDa (pic 4) y 96 kDa (pico 1), respectivamente.

Para el análisis de la Composición de Aminoácidos mediante el Sistema Pico – Tag, se realizó en los Laboratorios de Química de Proteínas del Instituto de Biología de la Universidad estatal de Campinas en Brasil, a través de cromatografía en HPLC del producto feniltiocarbamil perteneciente al aminoácido, proveniente de la derivatización con fenilisotiocianato de los aminoácidos obtenidos por hidrólisis ácida, donde se obtuvieron fracciones de caracteres diferentes, así tenemos que las fracciones correspondientes a los picos 1 y 2 se trata de proteínas ácidas por su elevada concentración de aminoácidos ácidos, mientras que en los picos 3, 4 y 5 se trata de proteínas ligeramente hidrofóbicas.

Los estudios de homología secuencial, se realizó mediante un análisis Bioinformático, usando el software DNASTar (Ver 5.0), de las proteínas 1 al 5 procedente de Chlorophytas filamentosas.

La secuencia del péptido tríptico de la cromatografía de interacción hidrofóbica generado en los picos 1 al 5, pertenecientes a las Chlorophytas filamentosas, es sometido cada péptido, a un estudio de homología secuencial a través de la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> identificando a las presentes con su respectivo número de acceso, así tenemos que para las secuencias

comparadas y ubicadas con homología secuencial de las cuales se obtuvo para el pico 1: O82059, P54243 y Q9FXM4; para el pico 2: P50375, P56292 y Q2EEV7; para el pico 3: P52810, Q9LXG1 y Q9FLF0; para el pico 4: P0DJ16, P51413 y Q4KTG9 y para el pico 5: Q4KTG9, P51413 y Q4GXH5; todas ellas mostrando un alto grado de homología secuencial con secuencias de proteínas procedentes en su mayoría de algas Embryophytas, confirmando la procedencia de las muestras y conservando las características propias de ellas, revelando que se tratan de esa familia de proteínas, disponibles en la base de datos consultada, con la que guarda un alto match o grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado mediante espectrometría de masa (MS/MS).

En general, se realizó una aproximación proteómica en material físico de la muestra, obteniendo resultados positivos dentro de la obtención del perfil de proteínas acumuladas diferencialmente relacionadas con este, una comparación con algunas otras especies ya estudiadas asemejando las propiedades físicas y químicas que podrían poseer, por lo que el presente trabajo de investigación fue desarrollado como una consecuencia por la necesidad de conocer, valorar y aprovechar de manera racional este recurso natural, de ahí la importancia de este estudio.

## INTRODUCCIÓN

El conocimiento más antiguo que poseemos referente al manejo de algas se remonta al periodo del Emperador Chino Shen Nang, (2700 años a.C.), donde la gente del lejano oriente las empleaba como alimento o con fines medicinales y sobre todo como fertilizantes. El ritmo de vida actual ha llevado a que los consumidores modifiquen sus hábitos ya que la industria alimentaria reoriente sus estrategias; en este entender no podemos dejar de lado las oportunidades que nos ofrece la naturaleza para lo cual con dicho tema daremos importancia, específicamente a las algas Chlorophytas filamentosas como una alternativa nutritiva dentro de la dieta alimenticia diaria además de su importancia en la salud y medio ambiente. Para entender bien este complejo campo, estableceremos en primer lugar que, a través del tiempo se ha notado un acrecentamiento en el aprovechamiento de las algas lo cual se deja notar dentro del campo de la tecnología de alimentos, ya que se registró un gran número de especies que pertenecen dentro de la dieta alimenticia las cuales son ricas en clorofila, carbohidratos y proteínas, así como se matiza su contenido en potasio, sodio, azufre, calcio, magnesio y cloro principalmente, a la vez son buena fuente de hierro, manganeso, cobre, zinc y cobalto. Por otro lado, algunas algas son buena fuente de yodo. De manera general las algas son una excelente fuente de vitaminas además de tenerse una gran disponibilidad y ser fácilmente cultivables (Quitral, 2012).

Las algas verdes están distribuidas tanto en hábitats acuosos como terrestres, siendo un grupo de gran impacto ecológico, son muy abundantes en agua dulce, donde suelen crecer de forma masiva si se encuentran en aguas ricas en nutrientes propios de aguas residuales (UNESCO, 2017). La mayoría tienen células sólidas con una matriz fibrosa, generalmente compuesta de celulosa. Actualmente son de interés, dado su importante contenido en proteínas, vitaminas y principios activos de importancia vital, tales como el yodo, fósforo, potasio, cloro, azufre, etc. y oligoelementos en dosis pequeña que no suelen ser tan frecuentes en otros alimentos más comunes (Acleto, 1971).

Las propiedades esenciales del grupo en estudio no se encuentran completamente documentadas, sin embargo, se tienen escasos antecedentes en las cuales se hace notar su interés dentro de la dieta diaria de personas y animales, para lo cual procedemos a realizar su estudio más a fondo, a través de una aproximación proteómica, destacando las principales propiedades de las Clorophytas filamentosas de importancia económica por ser especies cosmopolitas, a las cuales no se dio mucha importancia y que se encuentran en abundancia en la zona de estudio.

La determinación proteómica nos permitirá un nuevo concepto, para resolver si podemos aprovechar este recurso natural, como una fuente alterna de materia prima que puede ser incorporado dentro de la dieta alimenticia de la Región y desarrollar que en algún momento puedan llegar a ser cultivadas artificialmente, obteniendo una producción pura, y poder ser introducirla al mercado.

## **PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACION**

Consideramos que el consumo de algas ha sido muy importante para la nutrición de muchas culturas que se han desarrollado a orillas de cuerpos de agua. En su estado natural, las algas contienen 80 a 90% de agua. En base seca, contienen aproximadamente 50% de carbohidratos, 1-3% de lípidos y 7 a 38% de minerales. El contenido de proteínas es altamente variable (10-47%), con una alta proporción de aminoácidos esenciales. Uno de los beneficios de su consumo más evidentes para la salud, es su alto contenido de proteínas, vitaminas y minerales. Las algas contienen más vitaminas A, B12 y C, -caroteno, ácido pantoténico, ácido fólico, riboflavina y niacina que frutas y vegetales cultivados regularmente en tierra (Instituto de Ciencia y Tecnología, Puerto Montt – 2014).

La región Cusco ofrece áreas acuíferas ricas en estas especies a la cuales no se le da el debido interés, en algunos casos ha sido pobremente estudiada y explotada como una posible fuente alternativa de nutrientes, como por ejemplo el hierro. Al ser un alimento rico en nutrientes podría satisfacer muchos problemas alimenticios sobre todo en zonas de elevada pobreza al ser una planta cosmopolita que podría desarrollarse en cualquier ambiente lotico de manera rápida y sencilla, y así poder complementar problemas nutricionales. En este entender, podemos afirmar que existe una baja culturización e información sobre la dieta alimenticia alternativa en base a algas, la cual se encuentra accesible a los seres humanos refiriéndonos en este caso a las Chlorophytas filamentosas las cuales encontramos en una gran variedad de cuerpos de agua.

Las algas son uno de los organismos más abundantes e importantes que podemos encontrar en ambientes lenticos y loticos, ricos y abundantes sobre todo en agua. Su uso presenta una demanda creciente, la que es utilizada como una alternativa nutricional y medicinal, especialmente en las zonas rurales. Conscientes de esta realidad, se necesita construir y enriquecer la poca base de conocimientos y atacar las necesidades, con estrategias simples que permitan solucionar problemas frecuentes de nutrición.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Realizar el estudio de las Chlorophytas filamentosas de importancia económica mediante una plataforma de Aproximación Proteómica en la Cuenca del Rio Quesermayo – Distrito de Taray – Cusco.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar las especies de Chlorophytas filamentosas principales y de importancia, en la Cuenca del Rio Quesermayo a través de claves dicotómicas, características macroscópicas y microscópicas.
2. Purificar las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de cromatografía líquida, usando minicolumnas HiTRAP de interacción Hidrofóbica.
3. Determinar la masa molecular de las proteínas expresas de las Chlorophytas filamentosas, a través de la electroforesis de proteínas en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).
4. Determinar la secuencia de “novo” de las proteínas expresas a través de espectrometría de masas.

## JUSTIFICACION

En los últimos años, el uso de algas se ha convertido en la fuente importante dentro del uso cotidiano diverso, una de ellas es la generación de fuentes alternativas de energía a base de proteínas y vitaminas.

El desarrollo de la genómica promovió el estudio en proteómica haciendo de ésta una ciencia relativamente nueva; por lo tanto, aún no se encuentra información en este campo para muchas especies, como es el caso de varias de las especies de Chlorophytas filamentosas que encontramos en la zona de estudio. Se pretende incrementar los estudios sobre las Chlorophytas filamentosas de importancia económica de agua dulce como alternativas o suplementos alimenticios, de tal forma que se pueda regular nuestras dietas y hábitos para alcanzar una nueva estrategia de vida y salud.

En el presente trabajo se pretende incrementar la información sobre las Chlorophytas filamentosas, recolectadas de la cuenca del Rio Quesermayo, distrito de Taray, las cuales tienen una gran importancia económica, por lo que, al realizar el respectivo análisis dentro de sus propiedades fisicoquímicas y proteómicas, además de dar alcances sobre la potencialidad alimenticia que podemos obtener de dichas plantas ya sea para el ser humano como para los animales.

## **HIPOTESIS**

La cuenca del Rio Quesermayo cuenta con ambientes lóticos, en los cuales podemos encontrar Chlorophytas filamentosas de importancia alimenticia y medicinal, determinando su caracterización molecular de su secuencia proteica, para su posterior uso potencial como complemento dentro de la dieta alimenticia en la Región.

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### 1.1 ANTECEDENTES

Las especies del Genero *Cladophora*, presentan dentro de su composición cloroplastos reticulados y cuantiosos pirenoides, la liberación de sus gametos concierne a la célula apical. (ACLETO, 1971)

*Cladophora crispata*, especie encontrada en aguas continentales, encontrados en la Península de Capachica - Puno, precisamente en el Lago Titicaca. (ACLETO, Estudio de algas continentales del Perú, 1978)

El nostoc o “cushuro”, alga cianofita, de escaso valor nutricional, al ser un buen porteador de agua es considerado como un suplemento rico en proteínas. Los resultados porcentuales bromatológicos dieron como resultado, Proteínas 0,72%, Grasa: 0,30%, Azúcar: 0,13%. (ALDAVE, 1971)

A través del tiempo de acuerdo a las distintas variedades de especies estudiadas, se han encontrado amplias variaciones en la estructura química (proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y lípidos), las cuales están estrechamente relacionados con factores ambientales como las estaciones del año, temperatura, luz, salinidad, ubicación y condiciones de almacenamiento. (Dawes, 1998)

Dentro de las dietas andinas tradicionales, el nivel nutricional por unidad calórica es más elevado al de la dieta actual y más elevado aún que la dieta andina habitual de Puno rural. Abastecen un alto nivel el calcio, hierro, niacina, tiamina, riboflavina, y vitamina C. (FAO, 2000)

Dentro de la composición proteica de las algas tenemos en gran porcentaje glicina, arginina, alanina y ácido glutámico; a su vez incluyen aminoácidos esenciales en niveles diferenciales a los que indica la FAO/OMS como requerimientos básicos. Se puede determinar la baja presencia de Lisina y Cistina. (Rajapakse, 2012)

Existen especies como el “lanas y lechuga de río”, las cuales presentan un porcentaje proteico que oscila entre 16 y 31%, que combinados con proteínas de alta calidad biológica encontrados en la carne, leche o huevo, favorecen la absorción. Se muestra un alto consumo de algas dentro de las sociedades nativas, gracias a sus propiedades ricas en vitaminas y minerales además de ser catalogada como una alternativa nutricional que previene las enfermedades carenciales. No solo son ricos en nutrientes, sino que median dentro del proceso de la digestión estimulando la eliminación de grasa, se utilizan para la elaboración de productos cosmetológicos, se fabrican hilos quirúrgicos de sus derivados además de ofrecer propiedades anticoagulantes y antibióticas, es ampliamente utilizado en el campo de la medicina, como utilizada para reducir el colesterol de la sangre. (SUMARRIVA, 1985)

El consumo del “llasq’a”, como alimento alternativo dentro de la dieta alimenticia de los pobladores de Capachica constituye un complemento importante dentro de la tradición, un sustento alimenticio y terapéutico, que van rotando de generación a generación. (CORNEJO, 1986)

De las investigaciones realizadas, en los centros poblados de Siale y Chifrón - Península de Capachica, en relación a la distribución, biomasa y determinantes ecológicos de *Cladophora crispata*, se pudo determinar que el alga “llaska” solo vive en aguas limpias, en presencia de roca arenisca y con fluctuaciones promedio de oleajes de 0.40 a más de 1 m, temperatura promedio entre 13°C a 16.5°C, y profundidad de 0.5 a 1.50 m, en cuanto a la biomasa de hábitat natural registró un mínimo de 0.015 kg/m<sup>2</sup> a un máximo de 2.165 kg/m<sup>2</sup> . (CANALES, 2007)

De los estudios de biomasa de *Cladophora crispata* (alga llaska) en época seca y lluviosa en cinco Comunidades de la Península de Capachica, Puno. Se determinó la biomasa mediante la estructuración de cuadrantes aleatorios (1m<sup>2</sup>), realizando cortes al ras de la roca en un octavo del m<sup>2</sup>, pesándolo (Kg/m<sup>2</sup>) en una balanza analítica. No existe gran diferencia en las cantidades de lluvias entre ambas comunidades, al ser un factor climático importante debido a que ésta especie se desarrolla mejor en épocas de lluvia. (CANALES, 2007)

## **1.2 MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL**

### **1.2.1. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN DE WHITTAKER DE LOS SERES VIVOS (5 REINOS)**

En 1969, Robert H. Whittaker propuso una clasificación de los organismos en cinco reinos.

- Monera
- Protista
- Mycota (Fungi)
- Metaphyta (Plantae) y
- Metazoa (Animales).

Dicha clasificación se encuentra vigente hasta nuestros días. Sin embargo, se le ha hecho algunas modificaciones por las distintas investigaciones realizadas para que la teoría sea un poco más acertada. (MARTINEZ, 2017)

#### **REINO MONERA**

Fue el último reino que Whittaker propuso. En este agrupó a todos los organismos unicelulares procariotas (células sin núcleos). La creación de este reino se justificó gracias a las diferencias entre organismos eucariotas y procariotas. (MARTINEZ, 2017)

#### **REINO PROTISTA**

Agrupó a todos los organismos eucariotas unicelulares. Reconoció que los organismos de este reino se asimilaban a los organismos de los tres reinos superiores. Sin embargo, justificó su decisión señalando que la diferencia entre unicelulares y pluricelulares era lo suficientemente significativa como para que los unicelulares formaran un reino aparte. Dentro del reino Protista, Whittaker incluyó un subgrupo en el que se encontraban las bacterias. (MARTINEZ, 2017)

#### **REINO MYCOTA**

Para Whittaker, el reino Mycota estaba formado por organismos eucariotas pluricelulares. Antes de Whittaker, los organismos del reino Mycota eran catalogados como plantas. Sin embargo, la célula de estos organismos carece

de cloroplastos y de clorofila, por lo que son incapaces de producir alimento. En cambio, estos son heterótrofos y se alimentan absorbiendo sustancias en estado de descomposición u otra materia orgánica presente en los suelos. Los miembros de este reino según Whittaker eran las levaduras, los mohos y los hongos. (MARTINEZ, 2017)

## **REINO METAPHYTA**

En el reino Metaphyta, Whittaker agrupó a los organismos eucariotas, células con cloroplastos y pared celular. El hecho de poseer cloroplastos hace que estos individuos sean autótrofos (productores). Los helechos, gimnospermas y briófitas, fueron las primeras especies en formar parte de este grupo. Consecutivamente, se incluyeron las algas rojas y marrones a este reino. A medida de ésta decisión se pudo afirmar que las algas desempeñaban la misma función en ecosistemas marítimos como en terrestres; a raíz de esto, Whittaker las denominó como “plantas funcionales”. (MARTINEZ, 2017)

## **REINO METAZOA**

En el reino Metazoa, incluyó a los organismos heterótrofos (consumidores) los cuales son eucariotas con células sin pared celular y carentes de cloroplastos. Whittaker clasificó bajo este grupo a las esponjas, a los vertebrados e invertebrados. (MARTINEZ, 2017)

## **PUNTOS DE VALOR EN LA CLASIFICACION DE WHITTAKER**

1. La clasificación de Whittaker agrupa a los organismos tomando en cuenta ciertos criterios científicos, derivados de la investigación de las distintas características de estos. (MARTINEZ, 2017)
2. El sistema de clasificación de Whittaker toma en cuenta:
  - *La complejidad de las estructuras celulares:* Cuando se trata de organismos eucariotas (con la información genética contenida en núcleo definido) o de organismos procariotas (sin núcleo, la información genética se encuentra dispersa en el citoplasma de la célula).

- *La complejidad de los organismos*: Cuando se trata de individuos unicelulares (formados por una sola célula) o de individuos pluricelulares (formados por dos o más células).
- *Modo de nutrición*: Siendo autótrofos o heterótrofos.
- *Modo de vida (niveles tróficos)*: Cuando son productores (como las plantas), consumidores (como los animales) o descomponedores (como los hongos). (MARTINEZ, 2017)

3. La separación de los organismos de acuerdo al sistema de organización de los mismos hace que esta sea ampliamente aceptada en el mundo científico:

- Los procariotas forman parte de un reino independiente, ya que por ser primitivos no asemejan sus características a individuos de los demás reinos. (MARTINEZ, 2017)
- Los organismos unicelulares eucariotas pertenecen al reino Protista, excluyendo las dificultades que crean las semejanzas entre las plantas y los animales. (MARTINEZ, 2017)
- Los hongos no son tan primitivos como los organismos del reino Protista. Tampoco producen su propio alimento como las plantas. Por esto, se justifica que exista un reino aparte para estos individuos. (MARTINEZ, 2017)
- Las plantas son capaces de producir su propio alimento a través del proceso de la fotosíntesis. (MARTINEZ, 2017)
- Los animales se alimentan de otros organismos, por lo que se les denomina heterótrofos. (MARTINEZ, 2017)

### **1.2.2. ALGAS**

La definición del término “Alga” varia y es muy discutida según diversos autores. Se reconoce que agrupa a diversos filos de organismos con un origen evolutivo distinto, tanto eucariotas como procariotas (Brodie y Lewis, 2007; John et al., 2011; Guiry, 2012). La más reciente publicación sobre la clasificación de los eucariontes agrupa a las algas principalmente en tres supergrupos: SAR (Stramenophila, Alveolata y Rhizaria), Archaeplastida y Excavata. En el presente trabajo se sigue el concepto de “Alga” dado por Bicudo y Menezes (2006), Brodie y Lewis (2007), John et al. (2011) y Guiry (2012) quienes

consideran a las algas como organismos principalmente fotosintéticos, autótrofos (aunque algunos muestran heterotrofia y/o mixotrofia), de hábitat por lo general acuático, talófitos, de estructura unicelular, colonial o compuestos de tejidos simples, que no poseen envoltura o tejido de células estériles en sus órganos de reproducción. (MENDOZA, 2017)

#### **a) ALGAS VERDES**

Consideradas como grupo informal estrechamente relacionadas con las plantas terrestres. Taxonómicamente, incluye a los grupos de algas Chlorophyta y Charophyta. Se han descrito hasta ahora unas 10.000 especies diferentes, siendo las más diversas de todas las algas. Aunque se encuentran también en los mares, son más diversas en las aguas continentales (agua dulce) abarcando una amplia variedad de hábitat. Muchas son unicelulares, frecuentemente flageladas, pero otras desarrollan talos pluricelulares que nunca son muy complejos. Se encuentran presentes pigmentos como la clorofila, además de sustancias de reserva como el almidón la cual revela su parentesco con las plantas superiores. Hoy en día se admite que las plantas terrestres derivan de algas verdes dulceacuícolas de la clase Charophyceae (Iupillojv, 2013)

Las algas en su mayoría son de coloración verduzca, pero también pueden presentar una variedad de diferentes colores los cuales varían del rojo al amarillo en función de factores como la iluminación que absorban y de las inclusiones celulares que presenten (Cabioc'h et al., 2007), siendo de una gran diversidad morfológica (Finet et al., 2010), están distribuidas tanto en hábitats acuáticos como terrestres, siendo un grupo de gran impacto ecológico. Son muy abundantes en aguas continentales, donde crecen en forma masiva bajo una cantidad de nutrientes características de aguas residuales. La mayoría tienen células sólidas con una matriz fibrosa, generalmente compuesta por celulosa. Aunque todas las algas verdes se encuentran presentes taxonómicamente dentro de la División Chlorophyta, los mas actuales estudios moleculares (Finet et al., 2010; Leliaert et al., 2012), han incrementado nuestro conocimiento sobre su evolución y han mostrado que esta división como tal, hace referencia a un grupo parafilético a la cual pertenecen dos grandes progenies, aunque carentes aún de una aprobación con respecto a la categoría taxonómica, serían las

Chlorophyta sensu stricto, la cual circunscribe una mayor cantidad de algas verdes descritas, y las Charophyta, grupo parafilético que a su vez que incluye algas de aguas continentales además de algas microscópicas terrestres. Dentro de las Charophyta encontramos progenies de algas verdes de las cuales desarrollaron las plantas terrestres. (FUCIKOVA, 2014)

Existen asociaciones uni o pluricelulares, consideradas como parte del primer eslabón de la cadena alimenticia acuática, cuyas células no forman tejidos, se les encuentra en aguas continentales, salobre y marítima. Son elaboradores primarios capaces de transformar sustancias inorgánicas a orgánicas, que presentan metabolismo autótrofo utilizando un pigmento fotosintético primario que es la clorofila "A", característica muy similar al de las plantas superiores. (DRECKMANN, 2015)

## **b) CARACTERISTICAS DE LAS ALGAS A NIVEL CELULAR.**

### **- Envoltura Celular**

Las algas unicelulares se encuentran formadas solamente por una membrana plasmática, que puede estar o no reforzada por diferentes estructuras. Los euglenófitos presentan una película o periplasto, la cual corresponde a una capa de proteínas que se localiza por dentro de la membrana plasmática. En los criptófitos aparecen unas placas rectangulares o poligonales proteicas; en las dinofíceas estas capas se disponen formando unas corazas de celulosa. Algunas algas unicelulares presentan escamas silíceas, otras escamas calcáreas y las diatomeas tienen unas tecas o valvas silíceas. Las algas pluricelulares presentan la membrana plasmática de las células cubierta por una pared rígida exterior, formada en la mayoría de las veces por celulosa. (MENENDEZ, 2004)

En las algas verdes, esta celulosa aparece reemplazada o acompañada en algunos casos por otras sustancias como xilanos y mananos. En las algas pardas aparece además una serie de compuestos, los alginatos, que son polisacáridos. Las algas rojas presentan en la pared de celulosa otros polisacáridos como la gelosa y la carragenina. Son llamativos los depósitos de carbonato cálcico que se depositan en la pared celular de algunas algas rojas, confiriéndoles un aspecto pétreo en estos casos. (MENENDEZ, 2004)

### - **Cloroplastos**

En las algas, los caracteres ultra-estructurales de los cloroplastos (tales como la cantidad de membranas que lo rodean, así como el número y presentación de los tilacoides), han sido considerados como los más importantes para la separación de las divisiones que conforman el grupo. Por su origen evolutivo, podemos ver que algunos grupos exhiben la típica doble membrana, mientras que otros presentan tres o cuatro membranas, siendo generalmente la última membrana continua con el retículo endoplásmico. De estos cloroplastos algunos presentan tilacoides algunos aislados y otros en bandas apiladas de 2, 4 ó 6, denominándose como grana. En otros, como las algas rojas, uno o dos tilacoides se agrupan paralelos a la membrana interna del cloroplasto semejjando una membrana. (DRECKMANN, 2015)

### - **Ribosomas**

Un ribosoma es una partícula celular compuesta de ARN y proteína el cual es el lugar donde se sintetiza las proteínas dentro de la célula. El ribosoma lee la secuencia del ARN mensajero (ARNm) y, utilizando el código genético, se traduce la secuencia de bases del ARN a una secuencia de aminoácidos. Los ribosomas es un fragmento dentro del sistema de generación de proteínas en la célula. El ribosoma es una estructura de dos subunidades que se une al ARN mensajero. Esta estructura actúa como una estación de acoplamiento necesaria para la transferencia de ARN que contiene el aminoácido que pasará a formar parte de la cadena polipeptídica en crecimiento, que a la larga se convierte en una proteína. (GRAHAM, 2017)

### - **Pigmentos fotosintéticos**

La clorofila A, es el pigmento fotosintético (por excelencia), común en todas las algas y plantas embriófitas, alcanza un espectro de absorción de luz de 663–430 nm. Sin embargo, las algas presentan también otro tipo de clorofilas y pigmentos accesorios que les permiten un espectro de absorción mayor de la luz, de esta manera pueden abarcar una distribución más profunda en la columna de agua y realizar de manera óptima la fotosíntesis. (LOPEZ, 2018)

Encontramos además la clorofila B, la clorofila C (en sus formas C1 y C2) y la clorofila D, esta última de origen bacteriano, presenta un rango de absorción más amplio. La coloración externa de las algas se debe a la presencia de pigmentos accesorios. Al igual que las clorofilas, se encuentran en la membrana de los tilacoides en los cloroplastos, desde ahí captan los fotones de luz y los transportan al sitio activo (fotosistemas), necesarios para el inicio de la fotosíntesis. Los pigmentos accesorios más comunes en las algas son: las ficobilinas (ficocianinas y ficoeritrinas, solubles en agua), presentes sólo en algas verde azules y algas rojas, las fucoxantinas, las xantofilas y el más común y abundante, los carotenos. (Mish\_chan, 2019)

#### - **Sustancias de reserva**

En las células algales podemos encontrar diferentes sustancias de reserva producto del metabolismo. Las sustancias de reserva principales que podemos encontrar son el almidón, crisolaminarina, laminarina, manitol y paramilión en los diferentes grupos. Estas sustancias forman gránulos que se encuentran dispersos dentro del citoplasma celular, cloroplastos o en los pirenoides. (Mish\_chan, 2019)

#### - **Nutrición**

Las algas son consideradas como organismos autótrofos ya sean fotoautótrofos o quimioautótrofos. Tienen como principal fuente de nutrición la fotosíntesis. Otros grupos de algas presentan un tipo de nutrición heterótrofa ya sea osmotrófica, fagotrófica o saprobiótica. Y a la par algunos organismos presentan se valen de un tipo de nutrición mezclada, es decir por autotrofia y heterotrofia, a la cual se denomina mixotrofia, denominándose como mixótrofos. (Mish\_chan, 2019)

#### - **Niveles de organización**

El Nivel de organización se define como el grado de complejidad morfológica y fisiológica de un organismo. En las algas, podemos observar diferentes tipos de organización, desde el nivel unicelular el cual es el más sencillo hasta el mas complejo que es el pseudoparénquima de las algas pardas. (ORTIZ, 2019)

Los niveles de organización pueden ser clasificados de acuerdo al incremento en complejidad estructural como: (ORTIZ, 2019)

- Unicelular: diatomeas
- Multicelular:
  - Cenobio (merismopedia),
  - Colonia (volvox)
  - Filamento: simple (Spirogira), Ramificado (Cladophora)
  - Cenocítico/sifon: tabicado, no tabicado
  - Lamina: Monostromática (Ulva), Bistromática
  - Pseudoparenquima: Porphyra

#### - **Reproducción y ciclos de vida**

Las algas pueden reproducirse mediante dos procesos, la vía asexual, es el caso de las algas verde azules es típicamente fisión binaria y en otras algas unicelulares es mitosis, y la sexual en donde podemos observar oogamia, isogamia o anisogamia. El método de reproducción asexual consiste simplemente en la división repetida de un mismo organismo resultando en el incremento de la biomasa en una población, no implica recombinación genética. Contrariamente, la reproducción sexual implica la recombinación genética y con ella el aumento de la variabilidad genética en una población. El proceso de alternancia entre reproducción sexual y asexual o entre fases somáticas y fases nucleares de un organismo, se denomina ciclo de vida. En las algas podemos diferenciar tres tipos de ciclo de vida, que de acuerdo al sitio donde ocurre la meiosis, se denominan cigótico, gamético o esporico. (ORTIZ, 2019)

#### - **Habitat**

Las algas habitan en ambientes acuáticos (planctónicas, suspendidas en la columna de agua) o bentónicas (asociadas a un sustrato). Se encuentran en todas partes del mundo y tienen la capacidad de colonizar cualquier medio

ambiente, hay algas subaéreas, acuáticas y terrestres; dentro o sobre rocas, fango, arena, plantas o animales; en agua dulce, salada o salobre.

Habitán desde los lagos tropicales hasta las nieves alpinas y polares. Esto es debido a que son muy antiguas. Se han encontrado registros fósiles desde el Precámbrico, cuentan con mecanismos de dispersión y tienen plasticidad adaptativa. (EcuRed, 2004)

### **1.2.3. Importancia económica de las algas macroscópicas**

El ritmo de vida actual ha llevado a que los consumidores modifiquen sus hábitos y a que la industria alimentaria reoriente sus estrategias, en este entender no podemos dejar de lado las oportunidades que nos ofrece la naturaleza para lo cual con dicho tema daremos importancia, específicamente a las algas Chlorophytas filamentosas como una alternativa nutritiva dentro de la dieta alimenticia diaria además de su importancia en la salud y medio ambiente al respecto. Para entender bien este complejo campo, estableceremos en primer lugar que en los últimos años, se ha visto un incremento en el aprovechamiento de las algas en el campo de la tecnología de alimentos, ya que un gran número de especies son comestibles, son ricas en clorofila, carbohidratos y proteínas, así como se destaca su contenido de potasio, sodio, azufre, calcio, magnesio y cloro principalmente, también son buena fuente de hierro, manganeso, cobre, zinc y cobalto (Polanco, 2017)

Debido a las características del metabolismo de las algas, el hombre, al igual que otras especies, se favorece de los bioproductos que pueden ser obtenidos de las mismas. Entre estos se encuentran suplementos nutricionales, productos cosméticos y farmacéuticos, así como sus geles de variados usos. El mucílago presente en las algas son cadenas de polisacáridos que produce el alga, como resultado de su metabolismo, se usa incluso para formar las paredes como barrera de contención del medio que las circunda. (SEGARTE, 2010)

Los extractos de este mucílago son utilizados como materia prima por sus propiedades coligativas para la formación de geles rígidos y fuertes y con adecuadas propiedades reológicas para este tipo de formulación. (SEGARTE, 2010)

Las algas han cobrado valor en los últimos años debido a las dietas macrobióticas. Se conocen más de 24.000 diferentes especies de algas (algunas marinas y otras de agua dulce), pero para la alimentación humana, o con fines medicinales se utiliza un número reducido. Se asocian con la comida japonesa, pero se están recolectando algas ecológicas de gran calidad en el atlántico europeo, como el alga wakame, el alga agar-agar, el alga spaghetti (espagueti) de mar, el alga nori, el alga kombu, el alga dulce, etc. Las algas son poseedoras de mucha concentración de clorofila, un pigmento verde o de colores con la que estas plantas acuáticas son capaces de elaborar su propio alimento a través de la fotosíntesis. Las algas son realmente unas saludables plantas cargadas de fitoquímicos beneficiosos para la salud humana, no solamente son un importante alimento para nuestro metabolismo nutricional, sino también para nuestro metabolismo de la luz. Son muy ricas en energía solar y algunas de ellas almacenan energía luminosa (biofotones) que transmiten a las células energía y bienestar. (PUENTE, 2009)

#### **1.2.4. Propiedades Nutricionales de las Algas**

Las algas son uno de los alimentos que hay en la naturaleza con más contenidos en sales minerales y oligoelementos como el yodo y el hierro (100 gr de algas aportan el doble de hierro que 100 gr de lentejas). Las algas también aportan magnesio, cobalto, calcio, fósforo, potasio, etc. o el zinc tan necesario para que el cuerpo segregue bien la insulina, el hierro y el cobalto, que evitan la anemia, o el silicio y el calcio. Elementos imprescindibles para fortificar los huesos, las uñas, la piel y el cabello están en excelentes cantidades en las algas. La clorofila, muy presente en las algas activa enzimas del cuerpo que intervienen en la asimilación de los nutrientes para que estos se transformen en energía. También ayuda a purificar la sangre y para aumentar la fabricación de hemoglobina. Evita la contracción de los vasos sanguíneos y aumenta el rendimiento muscular y nervioso. (PUENTE, 2009)

### **1.2.5. Clasificación de las Algas**

Las investigaciones actuales sugieren que existen, al menos, 16 líneas filogenéticas, grupos de organismos con un antepasado común, o divisiones. Las líneas filogenéticas de las algas se definen según determinadas características:

- Estructura y composición de la pared celular.
- Los pigmentos fotosintéticos.
- Los productos de reserva.
- Los flagelos de las células móviles. (número, tipo y posición de los flagelos).
- Ultraestructura de los plastos, el pirenoide, zona del cloroplasto que participa en la formación de almidón.
- Mancha ocular, orgánulo constituido por una gran concentración de lípidos.

Las algas procarióticas, que carecen de membrana nuclear, se clasifican en el Reino Monera. Las formas unicelulares de las algas eucarióticas, que tienen su núcleo rodeado por una membrana, se incluyen en el reino Protista, al igual que las líneas filogenéticas con formas pluricelulares, aunque según ciertas clasificaciones estas últimas se incluyen en el reino Vegetal. Una hipótesis apunta que los orgánulos de las células de las algas han evolucionado a partir de endosimbiontes, organismos que viven en simbiosis en el interior de las células o de los tejidos de un huésped (PALACIOS, 2006)

### **DIVISION CHLOROPHYTA**

Se cuentan entre los organismos más antiguos; la primera alga verde aparece en el registro fósil hace más de 2.000 millones de años. Se les considera predecesoras de las plantas verdes terrestres, en esta división se agrupan las comúnmente conocidas como algas verdes, las cuales dominan los ambientes dulceacuícolas, pero que también se encuentran representadas en nuestros mares. Desde el punto de vista vegetativo presentan todos los niveles de organización y en lo que se refiere a la reproducción, exhiben la mayor variedad de ciclos vitales y de formas de reproducción que ninguna otra división. Estos

son considerados como los progenitores de las plantas terrestres, debido a su posición en la línea evolutiva que señala hacia éstas. (PALACIOS, 2006)

Se presentan a la clorofila A y B, B- caroteno además de otros carotenoides. El auténtico almidón es almacenado dentro del cloroplasto. La pared celular está compuesta, principalmente de celulosa, y en otros casos presenta polímeros o se encuentra calcificada. Algunas se desarrollan en suelos muy pobres, donde soportan largos periodos de desecación además de temperaturas extremas. Otras son psicófilas (que poseen crecimiento óptimo por debajo de 10°C), estas forman grandes manchas rosas, rojas o verdes visibles sobre la nieve. Otro grupo de algas verdes forma asociaciones simbióticas con hongos, constituyendo la parte fotosintética (ficobionte) de los líquenes. (CUBAS, 2008)

Se considera que los cloroplastos de las algas verdes derivan de procesos de endosimbiosis primaria, y en el árbol filogenético de las eucariotas se sitúan en el grupo Plantae, al lado de las algas rojas y de las plantas terrestres. Las algas verdes son extraordinariamente importantes desde el punto de vista evolutivo, ya que algunos grupos de estas, que se instalaron en el medio terrestre, fueron antepasados de los briofitos, y de las plantas vasculares. Por ello han sido extensamente estudiadas en cuanto a su morfología, ultra estructura y filogenia molecular (CUBAS, 2008)

Se caracterizan por tener unas cadenas de células con un aspecto filamentosos, en otros casos por agrupación de pelos o manojos compactos (p.e. Alga barba). A este género se le denomina Spyrogira. Existe otro género que también se da en agua dulce, Ulothrix cuyos filamentos no se ramifican y que forman una masa más compacta y pastosa. Dentro de esta categoría de algas filamentosas, tenemos el Genero Cladophora, que se constituye por conjunto de filamentos de color verde oscuro que pueden ir fijados al sustrato u otras plantas, o formando una bola, como la *Cladophora aegagropila*. (P&S, 2012)

La mayoría posee paredes celulares con dos capas, una interna de celulosa y otra externa con pectina, sustancia blanca amorfa que producen algunas plantas. Muchos clorófitos unicelulares se agrupan en filamentos y son visibles como musgo de río, se localizan también en el suelo húmedo, adheridas a las plantas

terrestres (algunas de éstas son parásitas), e incluso en la nieve y el hielo. (PALACIOS, 2006)

#### **1.2.6. Aplicaciones biotecnológicas**

Las algas durante la historia han sido utilizadas con diferentes fines, tal es el caso de la agarosa empleada en los laboratorios para la elaboración de medios de cultivo. Actualmente, existen varias aplicaciones en la industria de alimentos, como lo son espesantes naturales y la generación de biopolímeros como conservantes. Otra aplicación está enmarcada principalmente por microalgas, que están siendo utilizadas para la producción de biodiesel, combustible alternativo a los combustibles fósiles, que generan afectaciones grandes para la biosfera. (GRISALES, 2017)

El biodiesel se degrada mucho más rápido que los combustibles fósiles y genera menor cantidad de emisiones gaseosas que contaminan la atmósfera. El uso permanente de las algas con estos fines, se debe a la gran acumulación de ácidos grasos y lípidos en general, además, el crecimiento es rápido y pueden ser cultivadas en biorreactores o pequeños recipientes por lo cual no es necesario ocupar grandes espacios (GRISALES, 2017)

#### **1.2.7. Taxonomía y distribución de las cladophorales**

En el orden Cladophorales se encuentran algas tanto de agua dulce como salada y en algún caso contiene especies terrestres. Contiene algas con morfologías más o menos simples generalmente filamentosas o ramificadas. Muchas de las especies del grupo tienden a formar células gigantes, en algunos casos verdaderamente enormes superando los 10 cm de diámetro. (TAXATECA.COM, s.f.)

Presentan talos filamentosos uniseriados simples o ramificados, fijados al sustrato mediante rizoides, algunas veces con sistemas filamentosos postrados; poseen una ramificación con varios arreglos ya sea en uno o más planos, con desarrollo en los filamentos simples, indefinido y acortado a las zonas apicales

en las algas ramificadas. Presentan células con numerosos núcleos, cloroplasto 1, parietal, reticulado, numerosos pirenoides y pequeños cloroplastos en forma de discos, presentes en cada uno un pirenoide, sistematizados reticularmente; con pared celular estratificada y fibras de celulosa dispuestas en forma cruzada. Reproducción mediante fragmentación y por zoosporas 2-4-flageladas. Ciclos de vida con una alternancia de generaciones isomórfica e isogametos 2-flagelados. Distribución Cosmopolita (NOVELO, 2012)

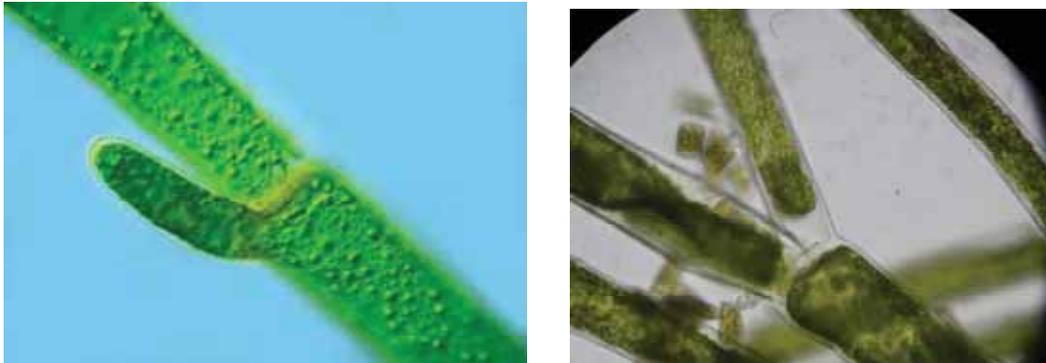


Figura 1 y 2: Ramificación pseudodicotómica de Cladophora

**Familia Cladophoraceae Wille**

Presentan talos filamentosos simples o ramificados, fijados al sustrato por un sistema de rizoides, que se forman a través de las células basales, rara vez sistemas filamentosos postrados; las ramas emergen de la parte superior de la célula como un crecimiento externo de la misma, de las deflexiones posteriores con respecto al eje principal resultan pseudodicotomías. De distribución. Cosmopolita. (NOVELO, 2012)

**Clave para la determinación de los Géneros**

- 1. Talos ramificados, células con abundantes núcleos.....Cladophora
- 2. Talos generalmente sin ramificaciones o muy escasas, células con 2-4 núcleos. .... Rhizoclonium

(NOVELO, 2012)

## Genero Cladophora Kützing

### - CLADOPHORA Kützing, Phyc. gen. 262 1843.

Con presencia de talos ramificados, filamentosos, largos, uniseriados, entremezclados y bénticos, pero a su vez pueden desarrollarse como autónomos flotadores; la célula basal se modifica en un área de fijación que puede complicarse para formar rizoides simples o complejos, al unirse con otras células. Poseen células gruesas, plurinucleadas cilíndricas y alargadas, con cloroplasto reticulado, abundantes pirenoides; pared celular gruesa y lamelada. Crecimiento únicamente apical y/o intercalar o también puede ser una mezcla de ambos. (NOVELO, 2012)

Ciclo vital diplobiótico (digenético), isomórfico. Muchas especies pueden ser marinas como de aguas continentales, estas últimas varían en su morfología, lo que en muchas ocasiones complica la identificación. Las especies de agua dulce se encuentran generalmente en ambientes hídricos fluidos (con correntía). Son de distribución Cosmopolita. (NOVELO, 2012)

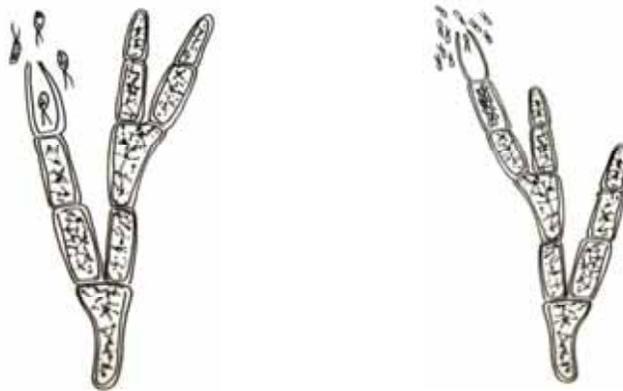


Figura 3: Cladophora: Gametófito y Esporófito  
(<http://www.plantasyhongos.es/algas/Cladophorales.htm>, 2014)

## Posición Taxonómica:

Reino *Plantae*,  
División *Chlorophyta*,  
Clase *Ulvophyceae*,  
Orden *Cladophorales*,  
Familia *Cladophoraceae*,  
Género *Cladophora*

Este género presenta numerosas especies difíciles de identificar (Kützing, 1843)



A) *Cladophora rupestris*



B) *Cladophora dalmatica*

### 1.3 Proteómica Funcional

Los proyectos de secuenciación a gran escala están proporcionando una ingente cantidad de secuencias de DNA. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes detectados. Así pues, el siguiente paso en la era post-genómica debe ser el estudio funcional de todos estos genes. (SANCHEZ, 2006)

Se puede decir que hubo tres factores decisivos para el desarrollo de la proteómica:

- La secuenciación de genomas a gran escala y el desarrollo de bases de datos de proteínas.
- El desarrollo de técnicas de espectrometría de masas para analizar proteínas y péptidos.
- Los avances realizados en la separación de proteínas mediante 2D-PAGE.

La proteómica es uno de los campos que puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico, constituyendo una herramienta importante en el análisis funcional de genes de función desconocida. (SANCHEZ, 2006)

El término “Proteoma” fue usado por vez primera en 1995 para describir el conjunto de PROTEÍNAS de un genOMA, en una célula o un tejido. De forma imperceptible, la palabra proteoma dio lugar a una nueva disciplina, la “Proteómica” (SANCHEZ, 2006)

Proteómica es el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma mediante métodos bioquímicos, con el fin de obtener una visión global integrada de los procesos celulares. El término proteómica se ha asociado tradicionalmente con la separación de un gran número de proteínas de una célula u organismo mediante 2D-PAGE. Según esto, la proteómica comenzó en los años setenta cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas utilizando la electroforesis bidimensional. Sin embargo, la identificación de las proteínas era difícil debido a la falta de métodos analíticos rápidos y sensibles para la caracterización de las proteínas (SANCHEZ, 2006)

En los años noventa la espectrometría de masas surge como un método analítico muy poderoso, ya que regula la mayoría de las limitaciones del análisis de proteínas. Este desarrollo, junto con la disponibilidad de los genomas secuenciados marca el comienzo de una nueva era. Actualmente muchas áreas de estudio han sido agrupadas dentro de la proteómica. Se pueden incluir, entre otros, los estudios de interacciones de proteínas, de modificaciones post-traduccionales, el análisis funcional de las proteínas y estudios de localización. (SANCHEZ, 2006)

Se puede hablar de dos tipos de proteómica: proteómica de expresión y proteómica del mapa celular. La proteómica de expresión es el estudio cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras que difieren en alguna variable. En esta estrategia se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La información obtenida puede permitir la identificación de nuevas proteínas implicadas. (SANCHEZ, 2006)

La proteómica del mapa celular o estructural es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína, mediante la purificación de orgánulos o complejos y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas. (SANCHEZ, 2006)

También se utiliza el término de proteómica funcional para referirse a diversas aproximaciones proteómicas que permiten el estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado proporcionando información importante de su función. (UPM, 2008)

### **1.3.1 Tecnología de la Proteómica**

El desarrollo de la proteómica se debe en parte a los avances importantes realizados en la tecnología de proteínas. Sin embargo, la metodología disponible tiene sus limitaciones y actualmente todavía no es posible realizar muchos tipos de proteómica. Es necesario mejorar algunas de estas limitaciones y desarrollar nuevas tecnologías para conseguir el máximo partido. Las cuatro plataformas de la tecnología proteómica son: (SANCHEZ, 2006)

- Preparación y manejo de la muestra
- Determinación de la información de la secuencia parcial de aminoácidos
- Identificación y cuantificación de proteínas
- Mapeo celular

### 1.3.2 Separación de Proteínas

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas.

Para muchas aplicaciones proteómicas, la electroforesis en una dimensión es el método de elección. Las proteínas se separan de acuerdo a su masa y como las proteínas son solubilizadas en dodecil sulfato sódico (SDS), no suele haber problemas de solubilización. Es una técnica sencilla, reproducible y permite la separación de proteínas de 10-300 KDa. Una de las aplicaciones más comunes de la 1-DE es la caracterización de proteínas después de realizar algún tipo de purificación previa (SANCHEZ, 2006)

La electroforesis bidimensional 2D-PAGE permite separar hasta miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas. Esta basada en una separación de proteínas en función de la carga, seguida de una separación de las proteínas en función de su masa molecular. La separación de la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque, durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta alcanzar una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoeléctrico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS. La alta resolución de la técnica se basa en que las dos separaciones se basan en parámetros independientes. La innovación clave para la 2D-PAGE fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado. (SANCHEZ, 2006)

El gradiente de pH inmovilizado elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga que iban asociados a los gradientes de pH preparados con anfolitos acarreadores. En los geles IPG, el gradiente es generado por las llamadas "inmobilinas" y está copolimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema ha permitido mejorar la resolución y reproducibilidad de los geles, así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada. La reproducibilidad conseguida con los IPGs ha hecho

posible la comparación de mapas entre distintos laboratorios, facilitando así el intercambio de información. (SANCHEZ, 2006)

En cuanto a la detección de proteínas, tradicionalmente se ha venido empleando el marcaje radioactivo o la tinción con azul de de Coomassie, o con plata, para conseguir mayor sensibilidad. También se ha desarrollado un método de tinción de plata superficial compatible con la digestión proteica y la espectrometría de masas, aunque el umbral de detección no es tan sensible como el seguido con los protocolos de tinción de plata mas utilizados. Así mismo, se han comenzado a utilizar tinciones y marcajes fluorescentes (Sypro-Ruby, Cy3, Cy5...) que presentan una sensibilidad comparable a la plata y también permiten el análisis posterior de las proteínas mediante espectrometría de masas. También se han desarrollado programas para comparar las imágenes de 2D-PAGE y facilitar la identificación y cuantificación de manchas de proteínas entre diferentes muestras. (SANCHEZ, 2006)

La aplicación principal de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión. En esta aproximación, la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cuantitativa. La aparición o desaparición de manchas proporciona información sobre la expresión diferenciadle proteínas y la intensidad de las manchas permite conocer los niveles de expresión. Para realizar estos estudios se pueden utilizar organismos completos, líneas celulares o fluidos biológicos. Se pueden comprar tejidos normales con tejidos enfermos, o células tratadas con drogas o diferentes estímulos. (SANCHEZ, 2006)

Otra aplicación importante de la proteómica del mapa celular, donde la 2DPAGE se utiliza para hacer mapas de proteínas de microorganismos, orgánulos celulares y complejos de proteínas. También se puede utilizar para caracterizar proteínas en subproteomas que se han obtenido mediante alguna forma de purificación del proteoma. (UAM, 2014)

La 2D-PAGE también presenta muchas limitaciones. Es una técnica muy laboriosa que requiere bastante tiempo, y difícil de automatizar. La 2D-PAGE está limitada por el número y el tipo de proteínas a resolver. Las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran en el gel durante la primera dimensión y las

proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien. Algunos de estos problemas se pueden resolver mediante fraccionamiento, la utilización de IPGs con diferentes rangos de pH. (SANCHEZ, 2006)

Otra limitación importante de la 2D-PAGE es la detección de proteínas poco abundantes, algunas de ellas se consideran muy importantes (proteínas regulatorias, proteínas implicadas en la transducción de señales, receptores). En estos estudios es necesario realizar un fraccionamiento de la muestra para reducir la complejidad de los extractos. Debido a estas limitaciones, la mayor aplicación de esta técnica en el futuro será el análisis y caracterización de subproteomas y de complejos proteicos. (SANCHEZ, 2006)

Las limitaciones de la 2D-PAGE han impulsado el desarrollo de otras metodologías. Una estrategia desarrollada consiste en digerir con tripsina una mezcla de proteínas para después purificar y analizar los péptidos mediante MS. Los péptidos se pueden purificar mediante cromatografía líquida, electroforesis capilar o mediante una combinación de técnicas como cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de fase reversa. La ventaja de este procedimiento es que se dispone de una gran cantidad de proteínas. Sin embargo, el análisis de los datos requiere una enorme cantidad de tiempo y ordenadores muy potentes. Además, se puede perder mucho tiempo y esfuerzo en el análisis de proteínas que no tienen interés (SANCHEZ, 2006)

### **1.3.3 Identificación y Caracterización de Proteínas**

En los proyectos proteómicos la identificación de proteínas es esencial. Es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles bidimensionales, la identificación de las manchas conduce a la creación de mapas de referencia, que definen las proteínas expresadas por unos organismos o tejido en unas condiciones determinadas. Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, co-migración con proteínas conocidas, y sobre-expresión y delección de genes. Todos estos métodos generalmente son lentos, laboriosos, o caros, y por tanto

no resultan apropiados para su utilización como estrategias a gran escala. (SANCHEZ, 2006)

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, la espectrometría de masas se ha convertido en el método de detección para la identificación de proteínas a gran escala, el primer paso para el estudio de proteoma de distintos organismos. También permite la caracterización de modificaciones post-traduccionales que presentan relevancia fisiológica, tales como la glicosilación y la fosforilación. (SANCHEZ, 2006)

El análisis de las proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias al desarrollo de varios métodos de ionización suave para convertir biomoléculas grandes, polares y no volátiles en iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masa están formados al menos por una fuente de iones, un analizador de masas y un detector que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de los iones en fase gaseosa. (SANCHEZ, 2006)

Esta técnica tan robusta implica:

a) La conversión de los péptidos en iones en fase gaseosa mediante técnicas de ionización suave, como ionización desorción con láser asistida con matriz (MALDI) a partir de una muestra en estado sólido, o la ionización mediante electrospray (ESI) de una muestra en solución. (SANCHEZ, 2006)

b) Separación de los iones según su  $m/z$  en un analizador de masas (por ejemplo un analizador tipo ToF (Time of Flight), cuadrupolo, trampa iónica, etc.) (SANCHEZ, 2006)

c) Fragmentación opcional de los iones peptídicos. (SANCHEZ, 2006)

d) Medida de las masas en un detector obteniendo un espectro de masas que refleja la abundancia de los iones frente a su valor  $m/z$ . (SANCHEZ, 2006)

Recientemente se han desarrollado también fuentes de MALDI que se acoplan a un analizador QToF o a dos analizadores ToF en tándem (MALDI-ToF/ToF). Para la identificación de proteínas se han desarrollado diversas estrategias.

Identificación mediante huella peptídica (PMF: peptide mass fingerprinting) o mapeo peptídico utilizando un espectrómetro tipo MALDI-TOF. (SANCHEZ, 2006)

Identificación mediante fragmentación de péptidos obteniendo la secuencia total o parcial de los aminoácidos (etiqueta de secuencia) utilizando un espectrómetro de masas en tándem. (SANCHEZ, 2006)

## **CAPITULO II**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **2.1 AREA DE ESTUDIO**

Las distintas tomas de muestra se realizaron en la cuenca de Quesermayo Distrito de Taray – Caca – Cusco, por ser una de las zonas donde encontramos en mayor cantidad Chlorophytas filamentosas especialmente entre los meses de Junio y Julio. (BUSTAMANTE, 2011)

##### **2.1.1 ACCESIBILIDAD**

La vía de accesos principal al ámbito del proyecto se realiza por la vía principal asfaltada Cusco - Písaq, así también existen tres vías carrozables o llamadas vías secundarias que interconectan las diferentes comunidades campesinas y microcuencas y caminos de herradura que interconectan en ámbito de estudio. (BUSTAMANTE, 2011)

##### **2.1.2 UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

Ubicada en la margen izquierda del Río Vilcanota, El distrito de Taray forma parte de los ecosistemas de montañas de los Andes del sur peruano, distinguidos por su alta inestabilidad. En efecto, a través de los diferentes estudios se demostró que el relieve del Distrito presenta una topografía variada altamente erosionada. En su región Puna, alcanza más de los 4200 m. de altitud y desciende con fuertes pendientes a la región Suni, entre los 3400 y 3800 m. de altitud, en la cual encontramos una extensa superficie que presenta poca pendiente, la cual dificulta el curso de las aguas pluviales, luego, nuevamente en fuerte declive desciende por la zona quechua hasta el piso del valle, 2900 m. de altitud, a orillas del Río Vilcanota, geográficamente se encuentra en 13°27'00" Latitud Sur y los 71°54'00" Longitud oeste. Taray tiene una extensión de 53 KM<sup>2</sup> La capital del Distrito está a 2968 msnm. (CAUSHI, 2013)

- **Ubicación Política**

**Región:** Cusco

**Provincia:** Calca

**Distrito:** Taray

- **Ubicación Hidrográfica**

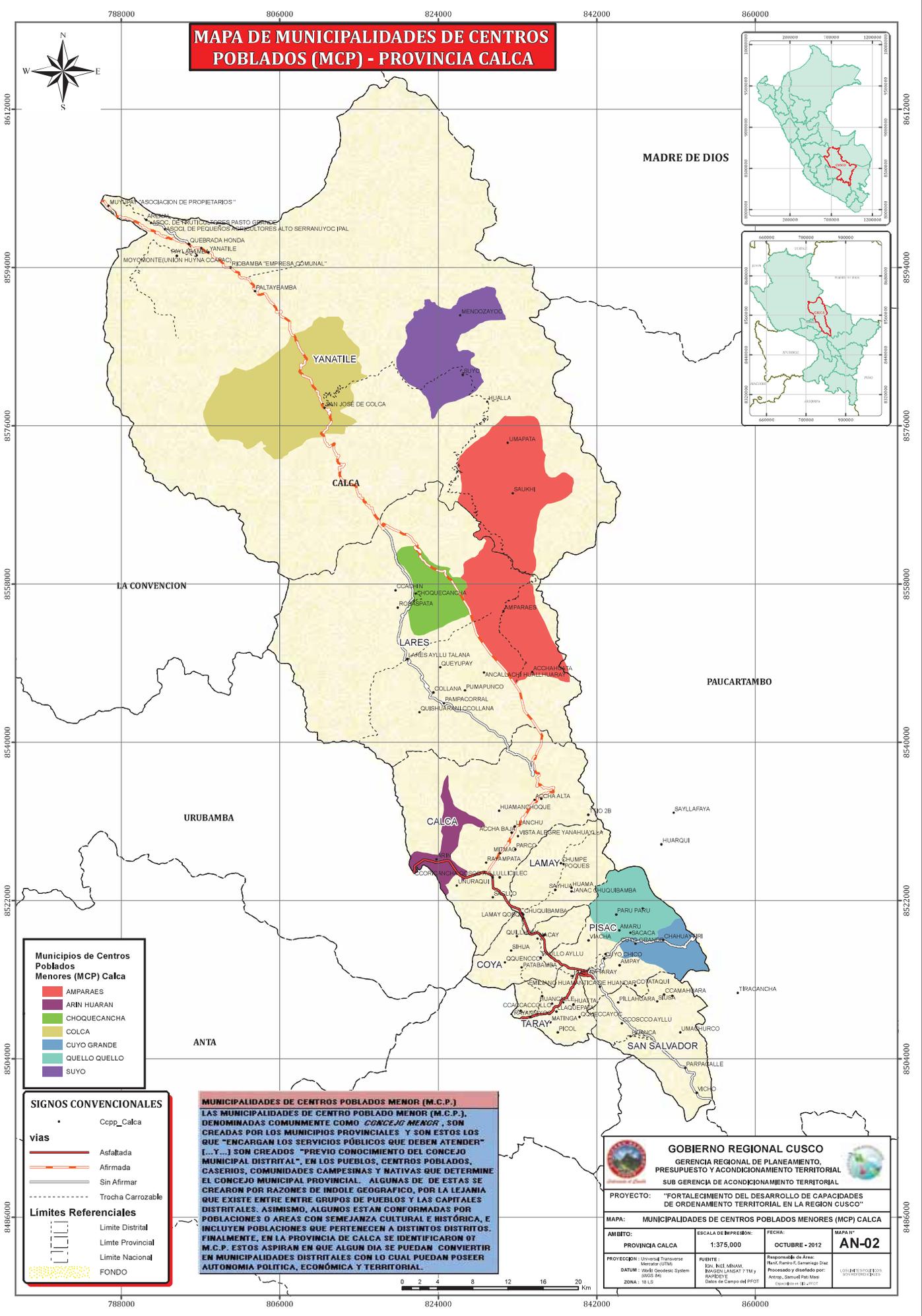
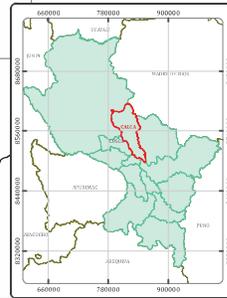
**Vertiente:** Atlántico

**Cuenca:** Vilcanota

**Subcuenca:** Quesermayo

- **Microcuencas:** Kallarayan, Ccaccacollo, Taray, Huaraccamayo y Pincheq.  
C.C.: Kallarayan, Ccaccacollo, Taray, Huancalle, Queccayoc, Huatta, Llaquepata y Matinga. (CAUSHI, 2013)

# MAPA DE MUNICIPALIDADES DE CENTROS POBLADOS (MCP) - PROVINCIA CALCA



- Municipios de Centros Poblados Menores (MCP) Calca**
- AMPARAES
  - ARIN HUARAN
  - CHOQUECANCHA
  - COLCA
  - CUYO GRANDE
  - QUELLO QUELLO
  - SUYU

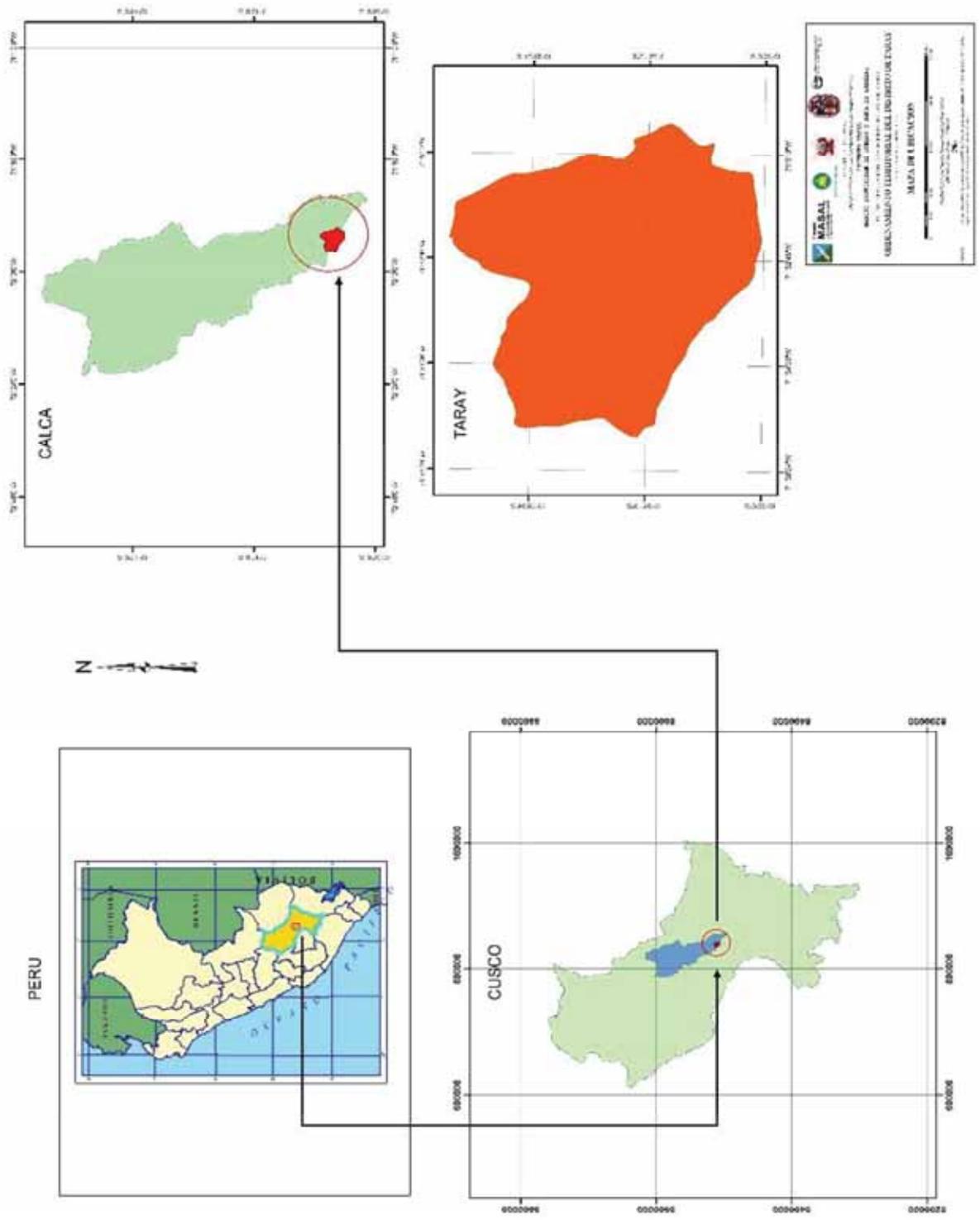
- SIGNOS CONVENCIONALES**
- vias**
- Ccpp\_Calca
  - Asfaltada
  - Afirmada
  - Sin Afirmar
  - Trocha Carrozable
- Limites Referenciales**
- Limite Distrital
  - Limite Provincial
  - Limite Nacional
  - FONDO

**MUNICIPALIDADES DE CENTROS POBLADOS MENOR (M.C.P.)**

LAS MUNICIPALIDADES DE CENTRO POBLADO MENOR (M.C.P.), DENOMINADAS COMUNMENTE COMO **CONCEJO MENOR**, SON CREADAS POR LOS MUNICIPIOS PROVINCIALES Y SON ESTOS LOS QUE "ENCARGAN LOS SERVICIOS PÚBLICOS QUE DEBEN ATENDER" L... Y J SON CREADOS "PREVIAMENTE CONOCIMIENTO DEL CONCEJO MUNICIPAL DISTRITAL", EN LOS PUEBLOS, CENTROS POBLADOS, CASERIOS, COMUNIDADES CAMPESINAS Y NATIVAS QUE DETERMINE EL CONCEJO MUNICIPAL PROVINCIAL. ALGUNAS DE ESTAS SE CREARON POR RAZONES DE INDOLE GEOGRAFICO, POR LA LEJANIA QUE EXISTE ENTRE GRUPOS DE PUEBLOS Y LAS CAPITALES DISTRITALES. ASIMISMO, ALGUNOS ESTAN CONFORMADAS POR POBLACIONES O AREAS CON SEMEJANZA CULTURAL E HISTÓRICA, E INCLUYEN POBLACIONES QUE PERTENECEN A DISTINTOS DISTRITOS. FINALMENTE, EN LA PROVINCIA DE CALCA SE IDENTIFICARON 07 M.C.P. ESTOS ASPIRAN EN QUE ALGUN DÍA SE PUEдан CONVERTIR EN MUNICIPALIDADES DISTRITALES CON LO CUAL PUEдан POSEER AUTONOMIA POLÍTICA, ECONÓMICA Y TERRITORIAL.



<b>GOBIERNO REGIONAL CUSCO</b>			
GERENCIA REGIONAL DE PLANEAMIENTO, PRESUPUESTO Y ACONDICIONAMIENTO TERRITORIAL SUB GERENCIA DE ACONDICIONAMIENTO TERRITORIAL			
PROYECTO: "FORTALECIMIENTO DEL DESARROLLO DE CAPACIDADES DE ORDENAMIENTO TERRITORIAL EN LA REGION CUSCO"			
MAPA: MUNICIPALIDADES DE CENTROS POBLADOS MENORES (MCP) CALCA			
AMBITO: PROVINCIA CALCA	ESCALA DE IMPRESION: 1:375,000	FECHA: OCTUBRE - 2012	MAPA N°: <b>AN-02</b>
PROYECCION: Universal Transverse Mercator (UTM)	FUENTE: INI, INEL, MINHA, INAGEN LANSAT 7 TM y PARQUE Datos de Campo del PIOT	Responsable de Área: Raúl Rentería S. Sarmiento Díaz Procesado y diseñado por: Arango, Daniel Fito Soto Diseñado por: GONZALEZ DE JESUS	LOGO MINISTERIO DE ECONOMIA Y FINANZAS PÚBLICAS



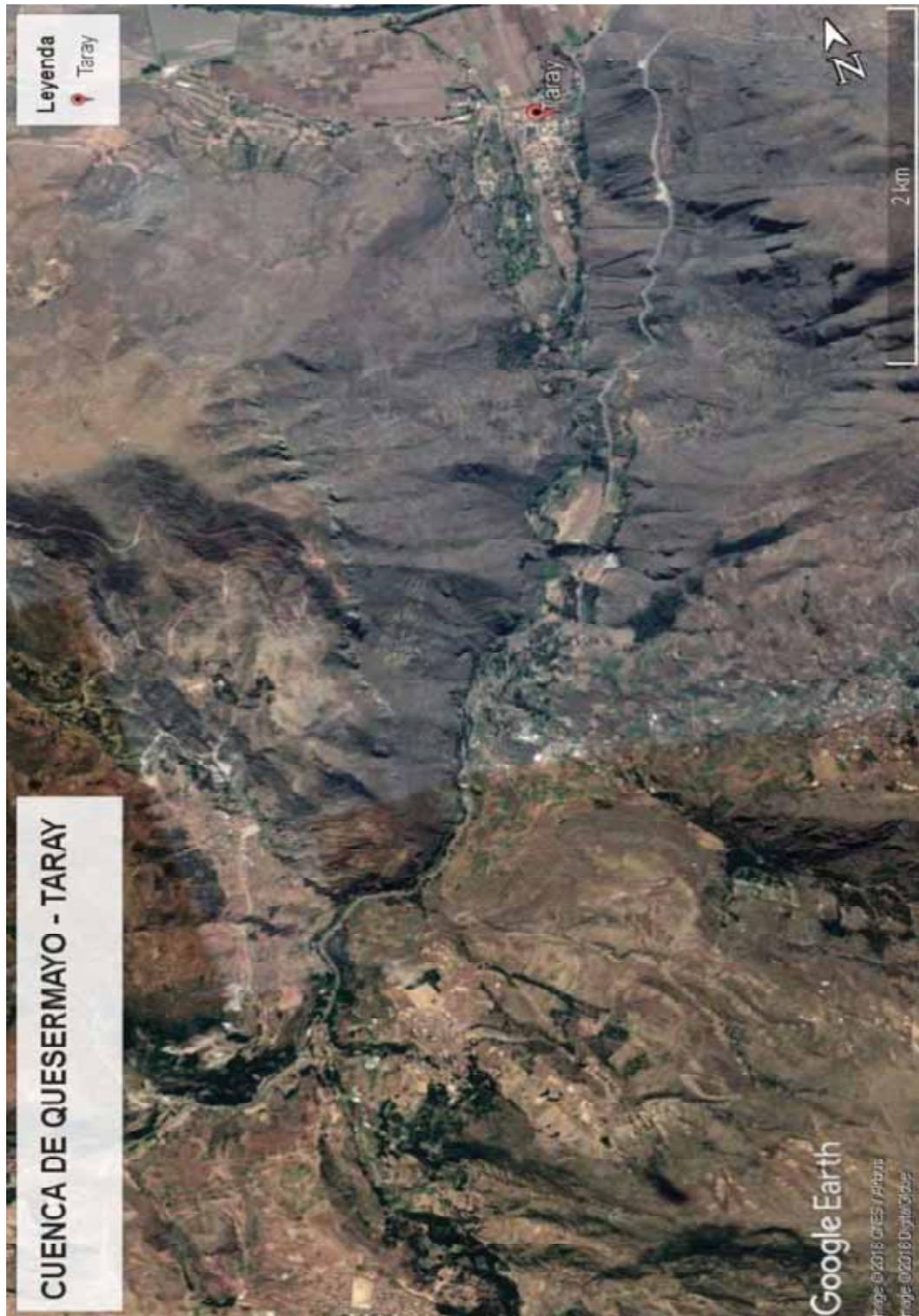


Figura 4: Cuenca de Quesermayo, distrito de Taray, tomada del Google Earth

Los pisos ecológicos del distrito están bastante definidos: el piso de valle, cuyo clima es entre cálido y templado, sin presencia de heladas; el piso intermedio con clima templado a frío y con presencia de heladas; y el piso alto o cabecera de cuenca que se caracteriza por fuertes precipitaciones pluviales, heladas y granizadas. Los riachuelos y manantes que discurren hacia el Vilcanota, configurando las pequeñas microcuencas, nacen de lagunas y a la vez son alimentados por la recarga de los acuíferos que dan lugar a las aguas subterráneas. Tienen cortos recorridos y una pronunciada pendiente y su volumen máximo se da entre los meses de febrero y mayo. (BUSTAMANTE, 2011)

Los suelos sufren erosión laminar por efectos de la acción hídrica y antrópica, muchos de ellos no son aptos para la agricultura, y en su mayoría son terrenos de secano. En las zonas altas crecen los pastos naturales, de propiedad comunal. Las especies forestales son escasas, particularmente en los pisos altos de las comunidades, y son sometidas al sobre pastoreo, a talas intensivas para la extracción de leña y para la construcción.

El acceso al distrito desde la ciudad del Cusco es por vía asfaltada, por la ruta Cusco Pisac. Desde allí, por diversos puntos, mediante trochas carrozables hacia las comunidades campesinas que la habilitan. (BUSTAMANTE, 2011)

### 2.1.3 CENTROS POBLADOS:

Los centros poblados están dispersos, siendo los centros poblados más importantes, Taray y Rayaniyoc. (BUSTAMANTE, 2011)

Cuadro 1. Centros Poblados del Distrito de Taray.

Nombre de Centro Poblado	Clasificación	Categoría
TARAY	URBANO	PUEBLO
TANARPATA	RURAL	CASERIO
PATABAMBA	RURAL	COMUNIDAD
HUANCALLE	RURAL	COMUNIDAD
KALLARAYAN	RURAL	COMUNIDAD
CCACCACCOLLO	RURAL	COMUNIDAD
PINCHEC	RURAL	ANEXO
HUAT'A	RURAL	COMUNIDAD
CCOCHAHUASI	RURAL	OTROS

CHITAPAMPA	RURAL	COMUNIDAD
LLAQUEPATA	RURAL	COMUNIDAD
RAYANNIYOC	RURAL	COMUNIDAD
PICOL	RURAL	COMUNIDAD
QUECCAYOC (QEAYOC)	RURAL	COMUNIDAD
MATINGA	RURAL	COMUNIDAD
PAULLO GRANDE	RURAL	OTROS

Fuente: INEI - Demarcación Política a Mayo 2002. (BUSTAMANTE, 2011)

#### 2.1.4 GEOMORFOLOGÍA:

El Distrito de Taray se caracteriza por presentar un relieve caracterizado en bajo, intermedio I, intermedio II e intermedio III. Así mismo, el distrito se caracteriza por presentar cerros, colinas altas, colinas bajas, laderas, mesetas y un valle. En este último se encuentra la mayor concentración de la población y la producción del distrito. (CAUSHI, 2013)

#### 2.1.5 GEOLOGÍA:

El distrito de Taray presenta depósitos glaciares, aluvial, formación Huancané, formación Maras, formaciones Quilque y Chilca, formaciones Ayabacas (Grupo Yuncaipata), formación Paucarbamba (Grupo Yuncaipata), formación Paucartambo, formación Rumicolca, Grupo Copacabana, Grupo Mitu, Grupo San Jerónimo. (BUSTAMANTE, 2011)

Cuadro 2. Formaciones geológicas del distrito de Taray. (CCORY, 2019)

Era Tema	Sistema	Serie	Unidad Litoestratigráfica	Area_m2	Area_ha	Porcentaje
Cenozoica	Cuaternario	Holoceno	Depósitos Glaciares / aluviales	6600405.66	660.04	12.14
Mesozoica	Cretacico	Inferior	Formación Paucarbamba	949678.33	94.96	1.75
Cenozoica	Cuaternario	Pleistoceno	Formación Rumicolca	2014942.37	201.49	3.70
Mesozoica	Creatacico	Inferior	Formación Huancane	1820435.32	182.04	3.35
Mesozoica	Creatacico	Inferior	Formación Maras	1564841.99	156.48	2.88
Cenozoica	Paleogeno	Paleoceno	Formaciones Quilque y Chilca	7448854.68	744.88	13.70
Paleozoica	Permico	Inferior	Grupo Copacabana	1956544.34	195.65	3.60
Paleozoica	Permico	Superior	Grupo Mitu	15837492.30	1583.74	29.14
Cenozoica	Paleogeno	Oligoceno	Grupo San Jerónimo	16139057.13	1613.90	29.70
<b>Total</b>				<b>54332252.162</b>	<b>5433.224</b>	<b>100.00</b>

Fuente: Mapas geológicos del Perú. (CCORY, 2019)

## 2.1.6 REGIONES NATURALES:

El distrito de Taray tiene una superficie de 5 433.22 ha. donde la actividad principal es la agricultura y ganadería, así mismo los recursos que se dispone en la zona como las condiciones medio ambientales determinan ciertas características propias, describiéndose a continuación:

De acuerdo a la clasificación de regiones naturales de Pulgar Vidal, en el Distrito de Taray encontramos 03 regiones naturales que a continuación describimos: (CAUSHI, 2013)

Cuadro 3. Regiones Naturales del Distrito de Taray. (CAUSHI, 2013)

Tipo	Alt_Min	Alt_Max	Area_m2	Área_(ha)	Porcentaje
Puna o Jalca	8200	9600	10247511.68	1024.75	18.86
Quechua	2500	3500	7047238.54	704.72	12.97
Suni	3500	4100	37037233.22	3703.72	68.17
<b>Total</b>			<b>54331983.45</b>	<b>5433.19</b>	<b>100.00</b>

Fuente: Gobierno Regional del Cusco

### a) Región Puna o Jalca

Este tipo climático se presenta en un área de 1 024.75 ha, que representan el 18.86% del territorio distrital, estas características hacen que esta zona presente un grado desfavorable para las actividades agrícolas y de regular para las actividades pecuarias, actualmente se desarrolla en esta zona la mayor explotación ganadera y agrícola; los habitantes han desarrollado sistemas propios de mejoramientos de riego de sus pastos (naturales y cultivados); la explotación ganadera es con ganado mejorado a criollo. (BUSTAMANTE, 2011)

### b) Región Quechua

Este tipo climático abarca un área de 704.724 ha que representan el 12.9 % del territorio distrital, se encuentra las comunidades de Paullo Grande, Huancalle y el mismo centro poblado de Taray, en esta región se caracteriza por encontrarse a piso de valle y con temperaturas óptimas para el desarrollo agropecuario; estas características hacen que esta zona presente un grado de favorabilidad regular para las actividades agrícolas y bueno para las actividades pecuarias. (BUSTAMANTE, 2011)

### c) Región Suni

Esta región es la más representativa del distrito y presenta un área de 3703.72 ha que representan el 68.17% del territorio distrital, se encuentra en esta región las comunidades de Ccaccacollo, Kallarayan, Chitapampa. (BUSTAMANTE, 2011)

#### 2.1.7 ZONAS DE VIDA

El distrito de Taray presenta 3 zonas de vida: bosque seco montano bajo subtropical (bs-MBS), bosque húmedo montano subtropical (bh-MS) y páramo muy húmedo subandino subtropical (pmh-SaS). (CCORY, 2019)

Cuadro 4. Zonas de Vida del Distrito de Taray.

Zona de Vida	Símbolo	Precipitación mm.		Temperatura °C		Altitud m.s.n.m.	
		Mín.	Máx.	Mín	Máx.	Mín	Máx.
Bosque seco montano bajo subtropical	bs - MBS	500	1,000	12	17	2,500	3,200
Bosque húmedo montano subtropical	bh - MS	500	1,000	6	12	2,800	3,800
Páramo muy húmedo subandino subtropical	pmh - SaS	500	1,000	3	6	3,900	4,500

Fuente: Mapa Digital del INRENA. (CCORY, 2019)

#### 2.1.8 CLIMA

Al distrito de Taray le corresponden dos tipos de clima:

El primero que corresponde a la zona de valle (orillas del río Vilcanota) con un clima caracterizado por una precipitación efectiva Semiseco, distribuido en el año durante la primavera y verano; con una eficiencia térmica templado y Humedad Atmosférica seca. El segundo caracteriza la parte alta del distrito: con una precipitación efectiva Semiseco, con una distribución anual entre primavera, verano y otoño, eficiencia de temperatura caracterizado por el frío y con una Humedad Atmosférica moderadamente húmeda. (CCORY, 2019)

## **2.1.9 PRINCIPALES RECURSOS NATURALES**

### **a) USO POTENCIAL DEL SUELO:**

La calcificación de suelos del Distrito de Taray por capacidad de uso mayor nos muestra que los suelos del valle aledaños al Río Vilcanota son suelos de clase A, profundos con alto potencial para la agricultura, los suelos de las comunidades de Rayanniyoc, Kallayaran, Huata y Huancalle son suelos de clase B, con capa A no muy profunda y con indicios de pedregosidad, las partes más altas son suelos pobres y erosionados en algunos casos suelo para pasturas naturales. (BUSTAMANTE, 2011)

En Taray podemos observar que la clasificación de los suelos por uso mayor está en conflicto permanente con los usos actuales, por cuanto los pobladores de Taray han implementado sistemas agroforestales con andenes en los suelos que por su pendiente serían de protección y han puesto a disposición de la agricultura; estos suelos actualmente reciben grandes cantidades de materia orgánica para poder producir hortalizas. En este punto es necesario anotar que los campesinos de Taray han clasificado el suelo en Suelos de Maíz o de valle, suelos para producción de hortalizas para el mercado, que se siembran bajo riego, suelos para cultivo de forrajes y suelos con pastos naturales. Es importante destacar que los suelos con pastos naturales son aquellos que actualmente están en descanso son también los llamados Laymes. (BUSTAMANTE, 2011)

La presencia de erosión es alta sobre todo en zonas donde el regío es por inundación y no hay terrazas, también en los laymes con excesiva pendiente, en general los suelos de Taray sobre todo aquellos que están en pie de ladera y ladera muestran un grado de erosión moderado. (BUSTAMANTE, 2011)

### **b) RECURSOS FORESTALES**

La forestación está orientada a establecer plantaciones forestales en sus diferentes diseños, a fin de rehabilitar condiciones ecológicas del medio, a través de su biomasa en los procesos de formación del suelo, infiltración del agua y la generación de microclimas. (BUSTAMANTE, 2011)

Las instituciones que han intervenido en esta zona pusieron énfasis en el establecimiento de especies forestales adaptadas al medio, para satisfacer las necesidades de las poblaciones de manera sostenida a través de la producción, instalación de plantaciones, manejo y aprovechamiento forestal.

Las actividades forestales se inician en el mes de diciembre hasta el mes de febrero para garantizar el prendimiento de los plantones. Se realizan dos tipos de plantaciones: la agroforestería que consiste en la instalación de plantones en entorno de las parcelas, en las orillas de los canales de riego, a las orillas de riachuelos, etc. La segunda es plantaciones en macizo consiste en formar bosques y bosquetes en su mayoría con especies exóticas en terrenos con aptitud forestal. (BUSTAMANTE, 2011)

Cuadro 5. Especies arbóreas por comunidad.

<b>Comunidad</b>	<b>Especies nativas</b>	<b>Especies exóticas</b>
Chitapampa	Retama Mutuy Chillca Tayanca Tancar Ccolle Queuña	Eucalipto Ciprés Pino Capuli Ceticio
Picol	Mutuy Chillca Tayanca Tasta Llaulli	Eucalipto Ciprés Pino Ceticio
Matinga	Chachacomo Queuña Ccolle Chillca	Eucalipto Ciprés Pino Ceticio
Ranyanniyoc	Retama Mutuy Tancar Ccolle Queuña	Eucalipto Pino Sauce Alamo Ceticio
Kallarayan	Tayanca Tasta Chiccha Queuña Ccolle Mutuy Retama	Eucalipto Ciprés Ceticio Capuli

Comunidad	Especies nativas	Especies exóticas
Ccaccacollo	Retama Chillca Ccolle Queuña Quiswar	Eucalipto Ceticio
Queccayoc	Queuña Ccolle Quiswar Tasta Tayanca Tinitn Tumbo	Ceticio Eucalipto
Huatta	Quiswar Retama Queuña Ccolle Tayanca Tancar Chillca Mutuy	Eucalipto Cipres Pino Ceticio
Huancalle	Quiswar Ccolle Retama Tayanca Molle Lloque Sauco Lambran	Eucalipto Pino Ciprés Sauce Alamo Ceticio
Llaquepata	Retama Mutuy Tayanca Queuña Llaulli tancar	Eucalipto Ciprés Ceticio

Fuente: Gobierno Regional de Cusco 2014. (CCORY, 2019)

### c) RECURSOS HÍDRICOS

El distrito de Taray se provee de agua principalmente del Río Taray, sin embargo, sus fuentes principales para los pequeños sistemas de riego se encuentran en la laguna de Qoricocha del distrito de Chinchero de la Provincia de Urubamba.

Los escasos manantes que existen cada vez tienen menores caudales, y ya no son suficientes para regar las tierras agrícolas, al mismo tiempo que ya hay conflictos de uso por el agua entre la población urbana y los regantes. (CCORY, 2019)

El Cuadro adjunto nos muestra los caudales existentes para los sistemas de riego y agua de consumo.

Cuadro 6. Disponibilidad del recurso hídrico (CCORY, 2019)

	Comunidad	Q. Vs disponibilidad	Ha con riego	Q. Vs disponible 1	Ha con riego	Q. Vs disponible 2	Ha con riego + potencial	Fuentes
1.	Chitapampa	14.4	13	18	17.2	16.95	40	Manantes
2.	Picol	14.5	8.5	13.7	14	12.35	10	Manantes
3.	Matinga	15	16	19.2	24	17.25	41	Manantes
4.	Rayanniyoc	8.3	9.5	13.7	18	13.04	39	Manantes
5.	Kallarrayan	9	10	10.25	13	8.85	30	Manantes
6.	Ccaccacollo	8.7	11	9.2	15.5	6.07	20	Manantes
7.	Queccayoc	10	8	14	13	13.8	20	Manantes
8.	Hualta	17.1	16.4	26.5	25.8	26.1	60	Manantes. Río Huaracamayo
9.	Huancalle	17.6	13.3	24	23.7	23.9	40	Manantes. Río Huaracamayo
10.	Llaquepata	9.4	8	10.4	44	9.7	30	Manantes
11.	Patabamba	17	15	28.5	27	25.4	50	Manantes, río Quenqomayo
12.	Paullo Grande	17	10	15	18	7	20	Manantes, río Quenqomayo

Cuadro 7. Síntesis de la situación actual de los Recursos naturales del Distrito de Taray.  
(BUSTAMANTE, 2011)

VARIABLE	PROBLEMA	POTENCIALIDAD	DINAMICA TERRITORIAL
AGUA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Distribución desigual del recurso en el territorio.</li> <li>• La geomorfología accidentada no permite la retención natural e hidrogeológica del recurso hídrico.</li> <li>• Contaminación del ambiente y del agua</li> <li>• Conflictos sobre el uso del recurso hídrico entre el consumo humano y producción agropecuaria</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• En la cabecera de cuenca se cuenta con lagunas que almacenan grandes cantidades de agua, los que pueden ser canalizados.</li> <li>• Aguas de buena calidad para consumo humano, agropecuario, piscigranjas y otras actividades.</li> <li>• Población sensibilizada para el uso adecuado del recurso agua.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cambio climático (proceso global)</li> <li>• Incremento de la demanda de agua para riego, por intensificación de la agricultura.</li> <li>• El aumento de áreas para el cultivo de hortalizas provoca una presión creciente sobre los recursos hídricos.</li> <li>• Uso incontrolado de productos químicos en la agricultura con la creciente contaminación del recurso agua. Paisaje natural, lagunas para turismo</li> <li>• Erosión y degradación de biodiversidad del Río Quesermayo.</li> </ul>
SUELOS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suelos pobres por erosión y geomorfología accidentada.</li> <li>• Suelos degradados por intensificación de la agricultura (intensificación del uso del suelo)</li> <li>• Suelos poco productivos por alto uso de fertilizantes e insecticidas.</li> <li>• La presión del hombre para desarrollar actividades agrícolas ha llegado a usar suelos de protección .</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• suelos de buena calidad en la parte alta, y en menos cantidad en la parte media y baja Creciente presión antropica sobre el recurso suelo</li> <li>• Disminución paulatina del recurso agua utilizable para el uso domestico y productivo</li> <li>• Suelo de valle con alta calidad productiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tendencia de monocultivos</li> <li>• Creciente contaminación de los suelos por la utilización de agroquímicos.</li> <li>• Creciente intensificación del uso del suelo por crecimiento de la población y intensificación de la agricultura.</li> </ul>

VARIABLE	PROBLEMA	POTENCIALIDAD	DINAMICA TERRITORIAL
VEGETACIÓN (Bosques)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plagas que atacan a especies silvestre</li> <li>• Quema de bosques y pastizales nativos</li> <li>• Expansión de áreas agrícolas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El distrito cuenta con una gran diversidad de vegetación natural.</li> <li>• Los bosques tienen un interés paisajístico considerando la actividad turística de la zona</li> <li>• Existen zonas adecuadas para la plantación de tara en las quebradas del distrito.</li> <li>• Potencial maderable de eucalipto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intensos programas de forestación, son ejecutados por la población.</li> <li>• Introducción de especies exóticas como el eucalipto</li> </ul>
PASTOS NATURALES	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quema de pastizales y pajonales</li> <li>• Pastoreo con diversidad de animales que perjudican el normal crecimiento de los patos (chancho, caballos, caprinos)</li> <li>• disminución de áreas de pastizal natural.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diversidad de especies palatables desde la zona baja a alta</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución acelerada de las principales especies palatables ocasionada por el sobrepastoreo y la quema</li> <li>• Zonas de pastoreo ocupadas para cultivos (laymes) y forestación de eucaliptos</li> </ul>
ZONAS DE RIESGO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Areas vulnerables en el distrito por deslizamiento de rocas en las quebradas y laderas por geomorfología accidentada superior a 40 % .</li> <li>• Areas con posibilidad de ser afectados por heladas.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• incremento constante de deslizamientos que afectan a zonas agrícolas, viviendas y red vial</li> </ul>

## **2.1.10 POTENCIALIDADES DEL DISTRITO**

- El distrito de Taray tiene vocación agropecuaria y la ubicación de sus terrenos, constituyen un verdadero potencial para la actividad agrícola y ganadera mediante la implementación de infraestructuras de riego mejorado y de pastos cultivados.
- Existencia de una PEA con un alto porcentaje de población joven (15 – 64 años de edad) 53.4% de la población total, con iniciativas para promover cambios sociales y económicos en el distrito.
- Potencial ganadero con iniciativas de reemplazar las razas criollas por mejorados.
- Presencia de complejos arqueológicos por revalorar.
- Existencia de variedad de plantas medicinales.
- Ubicación estratégica en el eje vial del valle sagrado de los Incas.
- Incremento sustancial de los recursos económicos y financieros de las municipalidades.
- Presencia de instituciones del estado y ONGs para apoyar en actividades de la actividad agrícola, pecuaria, alimentación y salud.
- Predisposición de los pobladores para asumir nuevos retos orientados al desarrollo comunal y Distrital.  
(BUSTAMANTE, 2011)

## **2.1.11 LIMITACIONES.**

### **- En términos Organizativos.**

- Débil voluntad política y compromiso de las autoridades y funcionarios municipales por llevar adelante una gestión del gobierno local transparente, participativa y democrática.
- Débil institucionalidad de la población.
- Incumplimiento de funciones en las juntas directivas.
- Inadecuado uso de los instrumentos de gestión comunal.
- Carencia de liderazgo.

- Debilidad en las organizaciones comunales, comités sectoriales y especializados: vaso de leche, club de madres y regantes.
- Trabajo desarticulado y hasta conflictos de intereses entre las organizaciones sociales de base y las instituciones. Como consecuencia de la no existencia de espacios de participación y concertación en el Distrito de Taray.

(BUSTAMANTE, 2011)

**- En Agricultura.**

- Escasez de agua para la actividad agrícola.
- Presencia de infraestructuras de riego con algunas deficiencias de organización de los regantes.
- Escasa disponibilidad de tierras para agricultura intensiva.
- Escasa rentabilidad y baja productividad, debido deficiencias en la gestión del agua de riego, la poca generación de valor agregado, articulación no consolidada al mercado, limitada cultura de respuesta organizada de los productores frente a las dinámicas del mercado, así como el desconocimiento de las tendencias de los precios y de la oferta y demanda.
- Presencia creciente de plagas y enfermedades.
- Presencia de heladas y otros imponderables de la naturaleza.
- Bajo precio de los productos.

(CAUSHI, 2013)

**- En ganadería.**

- Bajos rendimientos de las crías de animales menores y mayores.
- Escasez de agua para la producción pecuaria.
- Disminución de áreas de pastoreo libre.
- Escaso desarrollo de capacidades de los productores en la producción agropecuaria generándose un deficiente manejo ganadero.

(CAUSHI, 2013)

- **Medio Ambiente.**

- Contaminación de ríos, riachuelos y manantes es cada vez más grave, las existentes se han convertido en colectores de desagüe y botaderos de basura (desechos sólidos).
- Vulnerabilidad de ciertas zonas geodinámicas especialmente en las comunidades.  
(BUSTAMANTE, 2011)

- **En educación.**

- Limitada calidad educativa, debido a la estructura funcional de cada centro y nivel educativo. Esto se traduce en un fracaso escolar por el deficiente nivel de aprendizaje que tienen los estudiantes.
- Alto porcentaje de analfabetismo (14.8%). De la población total no sabe leer ni escribir.
- Alta proporción de centros educativos con deficiente equipamiento y recursos humanos (profesores) insuficientes, obligan a los padres de familia trasladar a los hijos a la ciudad del Cusco, Pisac, etc.  
(CAUSHI, 2013)

- **En salud.**

- Altos porcentajes de desnutrición crónica infantil.
- Limitada cobertura de los servicios de salud, particularmente en comunidades campesinas. La existencia de una enfermera en la capital del distrito no es suficiente para la población.
- A esta falta de personal médico se suma la escasez de medicamentos básicos
- Escasa cultura de salud preventiva por parte de los padres de familia, este hecho ha motivado en una creciente tasa de desnutrición, morbilidad y mortalidad infantil.

- Elevado número de casos de violencia familiar y de alcoholismo.  
(BUSTAMANTE, 2011)

## **2.2 MATERIALES**

### **2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO:**

- Chlorophytas filamentosas

### **2.2.2 MATERIALES Y EQUIPOS DE CAMPO:**

- **Materiales y Equipos de campo:**

- **Materiales**

- Libreta de campo (en la cual se registraron los datos referentes a los lugares de colecta y demás datos necesarios).
- Lápiz.
- Guantes.
- Recipientes herméticos
- Alcohol 96°
- Jeringa de 10 ml

- **Equipos**

- Cámara fotográfica marca Canon T6
- GPS Garmin 64S

- **Materiales y Equipo de laboratorio:**

- **Materiales**

- Porta y cubre objetos
- Pinzas
- Guantes quirúrgicos

- **Equipos**

- Microscopio (objetivos de 4X, 10X y 40X) Leica CM E
- Cámara fotográfica marca Canon T6

### **2.2.3 Materiales y Equipos de gabinete**

#### **a) PROTEOMICA**

- METODO DE BIURET

#### **b) DETERMINACION DE LA CURVA ESTANDAR DE PROTEINAS**

- Bovine Serum Albumine (BSA) en concentraciones de 2 a 10 mg
- NaOH 1M
- Reactivo de Biuret
- Incubadora
- Fotocolorímetro de Klett Summerson a 540 nm (filtro verde).

#### **- DETERMINACION DE PROTEINAS DE LA MUESTRA PROBLEMA**

- Muestra problema
- 1,0 ml de NaOH 1M
- Reactivo de Biuret
- Incubadora
- Fotocolorímetro de Klett Summerson a 540 nm (filtro verde).

#### **c) CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA EN MINI COLUMNAS HITRAP**

- Columnas de interacción hidrofóbica

#### **d) ELECTROFORESIS EN SDS – PAGE**

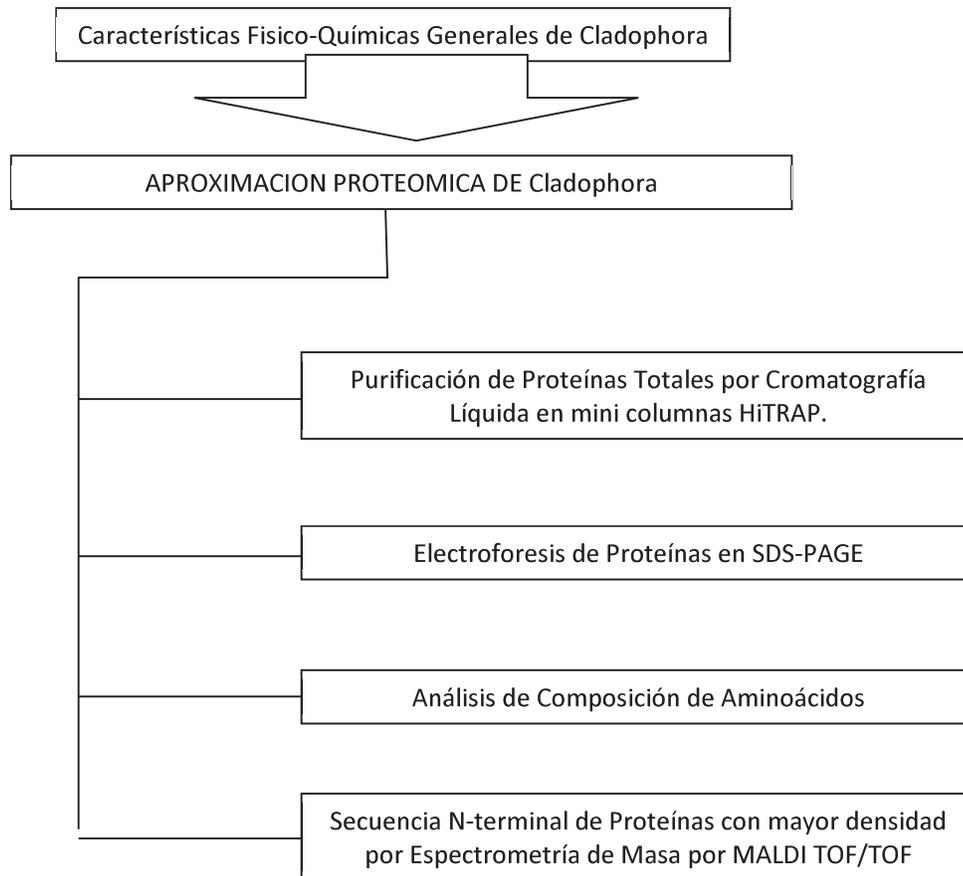
- Equipo de electroforesis
  - Cámara de electroforesis vertical y accesorios.
  - Micropipetas de 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
  - Vaso de precipitación de 500 mL de capacidad. 4 Flotadores para microtubos de 1,5 mL.
  - Gradillas de microtubos
  - Puntas descartables de polipropileno con capacidad para 20, 200 y 1000  $\mu$ L.
  - Solución de poliacrilamida al 30% .

- Buffer Tris-HCl 1,5 M pH= 8,8 .
  - Buffer Tris-HCl 0,5M pH= 6,8 .
  - Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% .
  - Persulfato de amonio (PSA) al 10% recién preparado.
  - N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED solución stock).
  - Agua bidestilada.
  - Buffer de resolución o corrida: Tris-Glicina
- Muestra problema
  - Padrones de masa molecular: fosforilasa B de músculo de conejo (97kDa), albúmina bovina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), Inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y alfa lactoalbumina de leche bovina (14 kDa).

Todos los solventes, productos químicos y reactivos químicos a utilizar son de un alto grado de pureza, procedentes de Aldrich (Aldrich Chemical Co, Inc. - Wisconsin, U.S.A.), Applied Biosystems (Applied Biosystems - Perkin Elmer Division, U.S.A.), Bio-Rad (Bio Rad Laboratories - California, U.S.A.), Merck (Merck - Darmstadt, Germany), Sigma (Sigma Chemical Co - St. Louis, U.S.A.), Pierce (Pierce Chemical Company - Illinois, U.S.A).523

## 2.3 METODOS

Flujograma de la determinación de proteínas y análisis de la composición de aminoácidos.



### **2.3.1 De la determinación Taxonómica de las especies de Chlorophytas filamentosas de importancia Económica en la cuenca de Quesermayo.**

#### **a) Colecta:**

La exploración, colecta y posterior estudio de una especie es indispensables en el proceso de estructuración y síntesis de sus propiedades fundamentales y características morfológicas. Es indispensable que las plantas que lo componen se hayan preparado y se conserven en el mejor estado posible para un mejor estudio.

Se ubicaron cinco puntos de muestreo a lo largo del río Q'esermayo, la recolección se realizó lavando con mucho cuidado de algunas impurezas como tierra y otros agentes extraños sin deteriorar o malograr la muestra.



Figura 5. Río Quesermayo con una notable cantidad de muestra de Chlorophytas

Se tomaron cinco muestras de 100 gramos colocando cada una en un recipiente hermético conteniendo el agua en el que discurre en la cantidad de 100 ml. A cada recipiente se agregó 2ml, 5 ml, y 10 ml de alcohol, rotuladas respectivamente, para su adecuada conservación hasta ser llevadas al laboratorio donde se realizaron los análisis respectivos.

La determinación taxonómica se realizó mediante los análisis macroscópicos y microscópicos de las muestras colectadas ayudados por bibliografía especializada, claves dicotómicas y consulta a especialistas.

## **b) Determinación taxonómica**

La determinación taxonómica de la muestra se obtiene de acuerdo a una observación física macroscópica y microscópica, para lo cual se toma una pequeña muestra para tomar nota de las características físicas y luego llevadas al microscopio y observarlas a diferentes objetivos tales son 4X, 10X y 40X, haciendo una recopilación fotográfica de las mismas para su determinación utilizando claves dicotómicas y consulta a especialistas.

### **- DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA:**

#### **Claves dicotómicas para el reconocimiento de las especies de Cladophora**

1. Filamentos gruesos, ramificaciones abundantes a regulares, principalmente basal..... *C. rivularis*
2. Filamentos delgados, ramificaciones regulares a escasas y dispersas.  
.....*C. glomerata*

### **- DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA:**

Se observó el color del talo, la suavidad al tacto, el tamaño de los filamentos, su adherencia al sustrato.

#### **2.3.2 De la purificación de las proteínas expresadas de las Chlorophytas, a través de cromatografía líquida, usando minicolumnas HiTRAP de interacción Hidrofóbica.**

##### **a) Obtención del extracto crudo**

El extracto crudo se obtuvo por la extracción del material seco al medio ambiente, así como del material fresco de las algas Chlorophytas, utilizando tampón fosfato de sodio monobásico 0,1 M pH 7.6 en constante agitación por un periodo de 2 horas.

El homogenizado que se centrifugo a 6000 g por 30 minutos. Después de la centrifugación el sobrenadante, denominado extracto crudo (EC), se ha dializado por 48 horas con agua destilada.

### **b) Determinación de proteína (Método de Biuret)**

#### **- Determinación de la curva estándar de proteínas**

Se realizó empleando Suero de Albumina Bovina (BSA) en concentraciones de 2 a 10 mg. (por triplicado a fin de elaborar los promedios).

Se añadió NaOH 1M hasta completar un volumen de 1 ml luego se añade 4 ml de reactivo de Biuret completando un volumen final de 5 ml.

Se incubo a 37°C por 30 minutos y fue leído al fotocolorímetro de Klett Summerson a 540 nm (filtro verde).

El factor de calibración se halló empleando la siguiente ecuación:

$$F.C. = \frac{\text{Concentración del estandar}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

#### **- Determinación de proteínas de la muestra problema**

A 0,1 ml de muestra problema se añadió 1,0 ml de NaOH 1M completando con 4 ml del reactivo de Biuret y obteniendo un volumen final de 5 ml.

Se incubo a 37°C por 30 minutos determinándose la cantidad de proteína en mg/ml multiplicando la absorbancia de la muestra problema por el factor de calibración.

$$\text{mg/ml} = F.C. \times \text{absorbancia problema}$$

#### **- Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en mini columnas HiTRAP**

Se utilizaron 400mg del extracto crudo fresco y seco, el mismo que se disolvió en tampón bicarbonato de amonio pH 8.0 , 0.1M. para ser homogenizado y clarificado a través de centrifugación a 600 g.

El sobrenadante obtenido fue aplicado en una mini columna HiTRAP, previamente equilibrada con tampón bicarbonato de amonio pH 8, 0,1M.

La corrida cromatográfica fue realizada a un flujo constante de 1 ml/10 min colectándose las muestras de 0,5 ml/tubo de forma manual.

El monitoreo de la corrida cromatográfica fue realizada a 280 nm.

### **2.3.3 Determinación de la masa molecular de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de la electroforesis de proteínas en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).**

#### **a) Electroforesis en SDS-PAGE**

La electroforesis en gel de poliacrilamida se realizó siguiendo la metodología descrita por Laemmli (1970).

-Las placas de poliacrilamida se realizaron de modo discontinuo, presentando un gel de concentración de 5 % y un gel de corrida de 12,5 %. Las placas fueron preparadas utilizando una solución de acrilamida stock (30%T, 0,8%C). El gel de concentración a 5 % se preparó utilizando un tampón Tris-HCl 0.5M pH = 6,8 y el gel de corrida fue hecho utilizando un tampón Tris-HCl 0.1M pH = 8,8 . En ambos casos a los geles se les agregó 0,1% de SDS 20%.

-La electroforesis PAGE-SDS fue realizada en sistema doble de miniplacas SE 250 Mighty Small II (Hoeffer scientific instruments). Las muestras y los marcadores de masa molecular fueron disueltos en tampón de muestra (Tris-HCl 0,075M; pH = 6,8; 10% glicerol; 4% de SDS; 0,001% de Bromofenol).

-La corrida electroforética se realizó a 30 mA. Los geles fueron coloreados con solución de Comassie Blue 0,05% a 37oC, y el exceso de colorante fue removido con ácido acético al 7%. Los reactivos para electroforesis se obtuvieron de Pharmacia SA CA USA.

Los patrones de masa molecular fueron: Fosforilasa b (94 kDa), albúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina de soya (20 kDa) y  $\alpha$ -lactalbúmina (14 kDa). Los demás reactivos como

dodecil sulfato de sodio (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250, acrilamida, N',N', metilenobisacrilamida, TEMED y persulfato de amonio (PSA), fueron adquiridos de Bio-Rad Laboratories.

#### **b) Análisis automático de aminoácidos.**

El análisis de aminoácidos fue realizado en un analizador automático de aminoácidos PICO TAG (Sistema waters), donde se identificaron los aminoácidos a través de una cromatografía en HPLC del producto feniltiocarbamil del aminoácido, proveniente de la derivatización con fenilisotiocianato de los aminoácidos que obtenidos por hidrólisis ácida. Esta forma de cromóforos puede ser detectada en concentraciones de 1 pmol, según la metodología descrita por Henrikson y Meredith (1984).

#### **Preparación de la muestra**

##### **Solubilización**

300 µg de la muestra fueron disueltos en 50 µL de tampón B (acetonitrilo 66% + TFA 0,025%) de HPLC (waters); se centrifugo a 200 x g por 15 minutos y se dividió en dos alícuotas de 25 µL cada una, posteriormente se seco con ayuda del work station (desecador-liofilizador que presenta acoplado un barómetro) hasta 65 milibar.

##### **Hidrólisis ácida**

Posteriormente las muestras (por duplicado) de 25 µL cada una, fueron colocadas en un frasco de reacción en sus propios tubos; enseguida se colocaron en el fondo del frasco de reacción 100 µL de una solución de HCl 6N, además de 1 mg/ml de fenol para evitar la formación de clorotirosina. Enseguida se realizó un vacío de aproximadamente 1-2 torr, hasta el inicio del burbujeo del HCl. Cerrado el vacío, se dejó entrar nitrógeno (SS-ultra puro) por 5 segundos. Esta etapa es repetida por tres veces. A continuación, se removió la tapa del frasco de reacción elevando la temperatura a 105°C para la hidrólisis que procedió por 24 horas. Después de este periodo, el tubo de reacción fue colocado en vacío hasta 65 millitorr para secar la muestra hidrolizada.

## **Derivatización**

A la muestra se le adiciono 20 µl de una solución de metanol, agua, trietilamina, 2:2:1 (v/v). Cada tubo fue agitado, centrifugado a 250 x g por 15 minutos y colocado en vacío hasta 65 millitorr para su evaporación. Este procedimiento remueve las sales y solventes adsorbidos por los aminoácidos. Una solución fresca de derivatización fue preparada con metanol, trietilamina, agua fenilisotiocianato (PITC), en la proporción 7:1:1:1 (v/v), siendo adicionados 20 µl a cada tubo de reacción y dejados a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de la derivatización, la muestra fue secada al vacío hasta 50 millitorr, para completar la remoción de todo el PITC. La muestra fue disuelta en 50 µl de una solución 0.4 mM de tampón fosfato de sodio conteniendo 5% de acetonitrilo.

El análisis de aminoácidos-PITC fue realizada en HPLC, usando una columna µ-Bondapack C-18 de fase reversa, con un gradiente lineal de 0 a 100% de acetonitrilo 60% por 21 minutos. La identificación de cada aminoácido fue realizada en relación a una corrida patrón de aminoácidos-PITC (Bidlingmeyer, et al., 1984). Para la cuantificación de cisteína y metionina, las muestras fueron previamente oxidadas con ácido per fórmico. La hidrolisis y la derivatización de las muestras oxidadas siguiendo la metodología descrita.

### **c) Secuencia de proteínas vía espectrometría de masa**

La caracterización molecular de las principales proteínas y péptidos constitutivos de las algas Chlorophytas, estará basada en protocolos establecidos para estudios de proteómica. Un análisis sugerido por la bibliografía ha conducido a considerar para los protocolos de extracción, pre-separación por cromatografía de interacción hidrofóbica y subsecuentemente la caracterización de los valores m/z y secuenciación por espectrometría de masa utilizando un espectrómetro de masa MALDI TOF-TOF 4800 Applied Biosystem (AB Sciex U.S.A.).

Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de las proteínas serán realizadas, por una parte mediante el programa PROTEIN PILOT, por otra parte con el programa DNA Star, previa consulta con las bases de datos contenidas en el NCBI.

La secuencia de las fracciones proteicas a estudiar en relación con el grado de homología de otras proteínas de secuencia conocida, será a través del servidor de la base de datos.

#### **2.3.4 Determinación de la secuencia de novo de las proteínas expresas a través de espectrometría de masas (Electrospray ESI y MALDI tof/tof).**

##### **Secuencia de proteínas vía espectrometría de masa**

La caracterización molecular de las principales proteínas y péptidos constitutivos de las algas Chlorophytas, se basaron en protocolos establecidos para estudios de proteómica. Un análisis sugerido por la bibliografía ha conducido a considerar para los protocolos de extracción, pre-separación por cromatografía de interacción hidrofóbica y subsecuentemente la caracterización de los valores m/z y secuenciación por espectrometría de masa utilizando un espectrómetro de masa MALDI TOF-TOF 4800 Applied Biosystem (AB Sciex U.S.A.).

Los análisis de secuencias peptídicas para la caracterización de las proteínas fueron realizados, por una parte, mediante el programa PROTEIN PILOT, y por otra parte con el programa DNA Star, previa consulta con las bases de datos contenidas en el NCBI.

La secuencia de las fracciones proteicas a estudiar en relación con el grado de homología de otras proteínas de secuencia conocida, se hicieron a través del servidor de la base de datos:

Medline/Entrez-PubMed1.htm

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 De la determinación Taxonómica de las especies de Chlorophytas filamentosas de importancia Económica en la cuenca de Quesermayo.

##### Clave para la determinación de la especie:

1. Talos ramificados, células con abundantes núcleos, cloroplastos reticulados .....Cladophora
  - 1.1. Filamentos delgados, ramificaciones regulares a escasas y dispersas..... *C. glomerata*

##### - Posición taxonómica (Hoek, Mann & Jahns)

Reino *Plantae*,

División *Chlorophyta*,

Clase *Cladophorophyceae*

Orden *Cladophorales*,

Familia *Cladophoraceae*,

Género *Cladophora*

Especie *Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützing Seattle

Nombre común: *Mayulaq'o, llask'a, cabellos de venus*

##### 3.1.1 OBSERVACION MACROSCOPICA

Alga de color verde oscuro con ramificaciones alternas regulares, ásperas al tacto, dispersas se fijan al sustrato limoso y lítico por una serie de órganos de fijación (rizoides). Alcanzan de 10- 12 cm de longitud. Abundan en zonas de aguas calmadas y limpias formando matas flotantes.

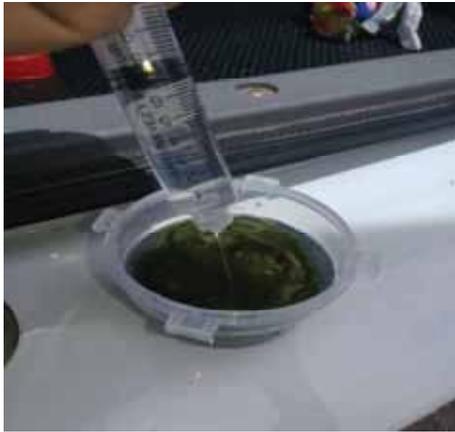


Figura 6 y 7. Observación macroscópica una vez recolectada la muestra donde se observa sus ramificaciones alternas regulares, ásperas al tacto y dispersas.



Figura 8. Observación macroscópica de filamentos alternos regulares, color verde oscuro, áspero al tacto.

### **3.1.2 OBSERVACIÓN MICROSCOPICA**

Talos filamentosos ramificados fijos al sustrato por rizoides, células multinucleadas, cloroplastos reticulados con numerosos pirenoides, crecimiento principalmente apical, ramificaciones simples regulares la mayor densidad de las ramas se encuentra principalmente al final de las ramas de primer y segundo

orden, de cada célula emergen 1-3 ramas, diferentes en talla al eje principal, con pseudodicotomías evidentes.



Figura 9. Observación de la muestra a 4x



Figura 10. Observación de la muestra a 10x



Figura 11. Observación de la muestra a 40x

VISTA GENERAL DEL TALO, TIPOS DE RAMIFICACIÓN, PARTE BASAL.

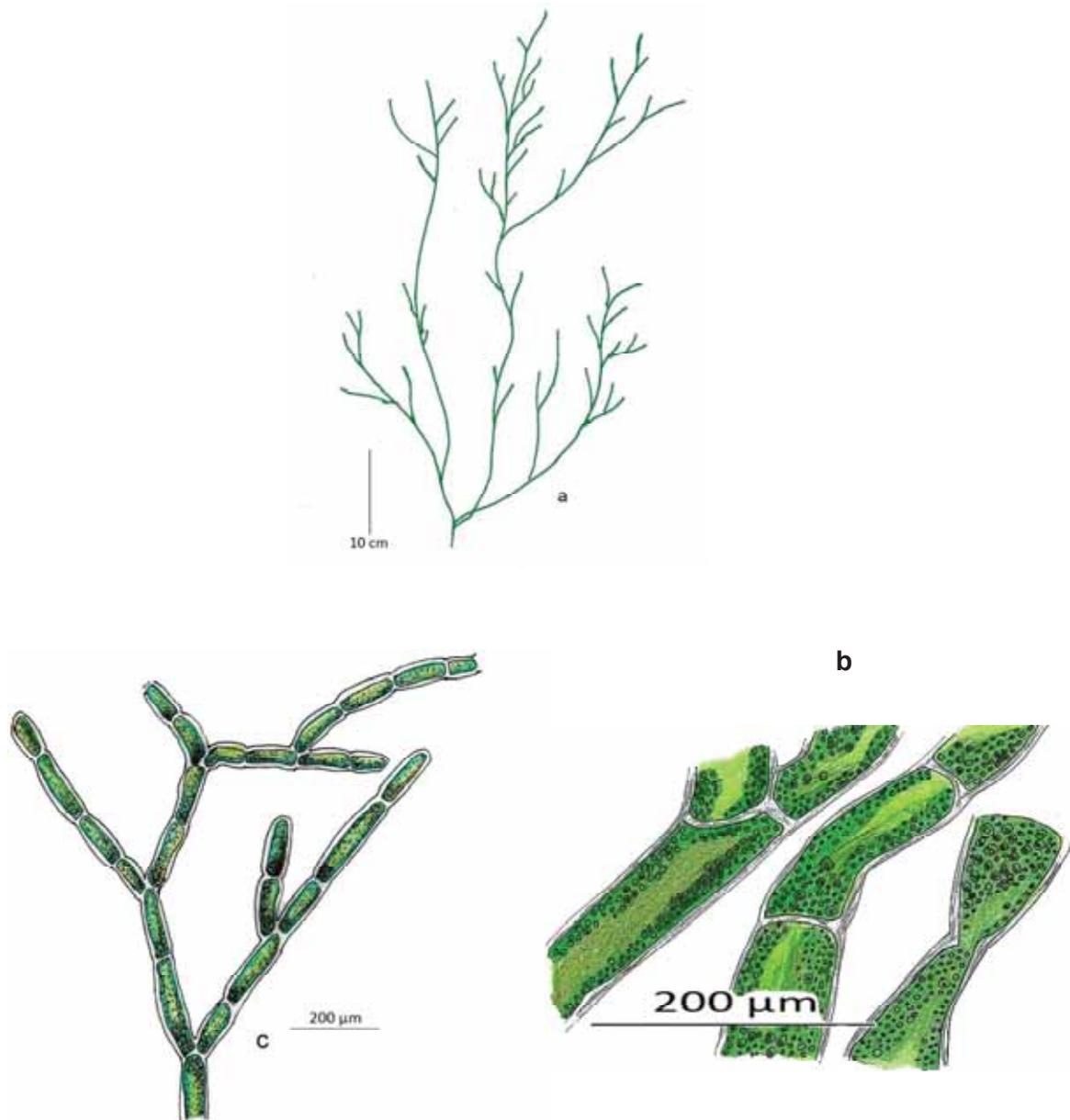


Figura 12, 13 y 14. *Cladophora glomerata*. –a. Vista general del talo. –b. Tipos de ramificación. –c. Parte basal.

**3.2 De la purificación de las proteínas expresas de las Chlorophytas filamentosas, a través de cromatografía líquida, usando minicolumnas HiTRAP de interacción Hidrofóbica.**

**3.2.1 Determinación de proteína (Método de Biuret)**

**a) Determinación de la curva estándar de proteínas**

Cuadro 8. Valores de la determinación de la curva estándar de proteínas.

[mg/mL]	Abs (X)	F.C.
2	0.105	19.048
4	0.205	19.512
6	0.310	19.355
8	0.410	19.512
10	0.500	20.000

$$\text{F.C. X} = 19.485$$

El factor de calibración fue de **19,485**

**b) Determinación de proteínas de la muestra problema**

- $\text{mg/mL} = \text{F.C.} \times \text{absorbancia problema}$
- $\text{mg/mL} = 19.485 \times 0.616 = 12 \text{ mg/mL}$

**3.2.2 Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en mini columnas HiTRAP**

El extracto crudo procedente de Chlorophytas filamentosas fue aplicado en una columna de interacción hidrofóbica y reveló la presencia de 7 picos, siendo el pico 5 aquel que mostró encontrarse en mayor concentración de la muestra estudiada

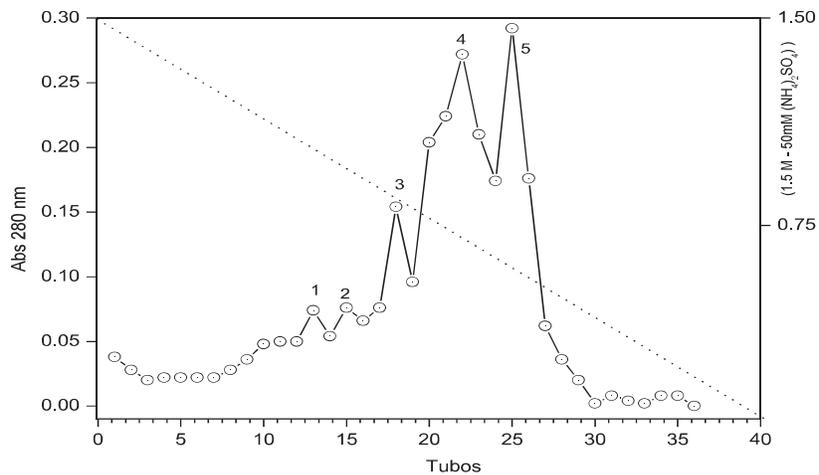


Figura 15. Cromatografía de interacción hidrofóbica, previamente equilibrada con 0,2mM de bicarbonato de amonio, pH 7.9. 10 mg. del extracto crudo procedente de Chlorophytas filamentosas, fueron aplicados. Las fracciones fueron eluidas con un flujo de 10 ml./h. y con un gradiente lineal 20mM a 1M de bicarbonato de amonio y las fracciones fueron colectadas y almacenadas para posterior estudio.

### 3.3 De la determinación de la masa molecular de las proteínas expresas de las Chlorophytas, a través de la electroforesis de proteínas en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).

#### 3.3.1 Electroforesis en SDS-PAGE

El perfil de masa molecular en electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 purificadas a partir Chlorophytas filamentosas, evidencian una masa molecular relativa de 15 (pico 4), 22 (pico5), 30 (pico3), 48 (pico 4) y 96 (pico 1) kDa respectivamente.

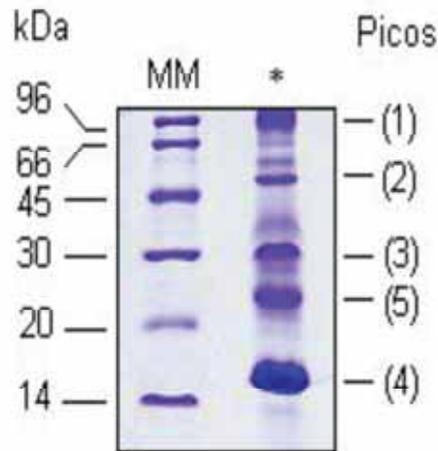


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) (12.5 %) de las fracciones protéicas purificadas a partir Chlorophytas filamentosas (picos 1 al 5 respectivamente). Mm marcadores de masa molecular (kDa).

### 3.3.2 Determinación de la masa molecular relativa

El cálculo de la masa relativa ( $M_r$ ) fue realizado a través del gráfico del logaritmo de la masa molecular de los marcadores como de la muestra ( $\log M_r$ ) x movilidad relativa o distancia migratoria de los marcadores proteicos ( $R_f$ ), utilizando el software Origin 5.0 Inc Company CA. USA. (Figura 19). La distancia migratoria de las fracciones purificadas partir de Chlorophytas filamentosas, fueron: Pico 1: 96; pico 2: 48; pico 3: 30; pico 5: 22 y pico 4: 15 kDa respectivamente.

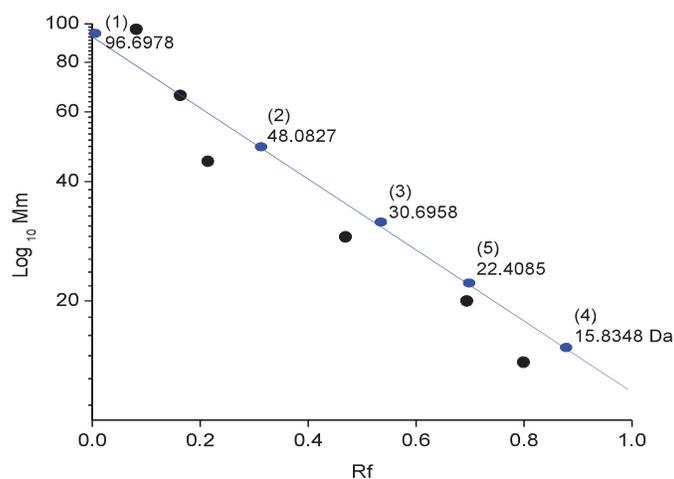


Figura 17. Determinación de la masa molecular relativa de las fracciones purificadas a partir Chlorophytas filamentosas.

### 3.3.3 Análisis de Composición de Aminoácidos (Sistema Pico – Tag).

En relación el análisis de composición de aminoácidos de las fracciones protéicas purificadas a partir Chlorophytas filamentosas, nos sugiere que se trata de proteínas con caracteres diferentes, así tenemos que las fracciones correspondientes a los picos 1 y 2 se trata de proteínas con un carácter ácido por su elevada concentración de aminoácidos ácidos, en tanto que las proteínas 3, 4 y 5 se trata de proteínas ligeramente hidrofóbicas, tal como se indica en la siguiente.

Cuadro 9. Análisis de Composición Global de Aminoácidos de las fracciones proteicas purificadas a partir de Chlorophytas filamentosas, evidenciando el carácter de cada una de ellas

Aminoácido	Picos									
	1	(%)	2	(%)	3	(%)	4	(%)	5	(%)
Asx	26	3.2	21	5.3	16	6.7	9	7.3	9	4.9
Glx	34	4.1	23	5.8	17	7.1	8	6.5	12	6.5
Ser	44	5.4	22	5.5	15	6.3	11	8.9	14	7.6
Gly	55	6.7	19	4.8	9	3.8	12	9.7	11	5.9
<b>His</b>	<b>73</b>	<b>8.9</b>	<b>51</b>	<b>12.8</b>	<b>29</b>	<b>12.1</b>	<b>16</b>	<b>12.9</b>	<b>15</b>	<b>8.1</b>
<b>Arg</b>	<b>76</b>	<b>9.3</b>	<b>42</b>	<b>10.5</b>	<b>35</b>	<b>14.6</b>	<b>14</b>	<b>11.3</b>	<b>18</b>	<b>9.7</b>
Thr	35	4.3	18	4.5	16	6.7	6	4.8	9	4.9
Ala	51	6.2	10	2.5	9	3.8	6	4.8	6	3.2
Pro	45	5.5	22	5.5	9	3.8	2	1.6	13	7.0
Tyr	63	7.7	11	2.8	15	6.3	4	3.2	6	3.2
Val	56	6.8	15	3.8	14	5.8	5	4.0	12	6.5
Met	2	0.2	2	0.5	1	0.4	1	0.8	1	0.5
Cys	14	1.7	6	1.5	16	6.7	6	4.8	6	3.2

Ile	59	7.2	26	6.5	9	3.8	6	4.8	15	8.1
Leu	62	7.6	35	8.8	6	2.5	3	2.4	9	4.9
Phe	54	6.6	31	7.8	9	3.8	3	2.4	8	4.3
<b>Lys</b>	<b>72</b>	<b>8.8</b>	<b>45</b>	<b>11.3</b>	<b>15</b>	<b>6.3</b>	<b>12</b>	<b>9.7</b>	<b>21</b>	<b>11.4</b>
Trp	*ND									
<b>Total</b>	<b>821</b>	<b>100.0</b>	<b>399</b>	<b>100.0</b>	<b>240</b>	<b>100.0</b>	<b>124</b>	<b>100.0</b>	<b>185</b>	<b>100.0</b>

. \* No determinado.

El análisis de composición global de aminoácidos, muestra que se trata de proteínas con determinada estabilidad estructural en razón de la presencia de su contenido de cisteínas, así tenemos que las fracciones proteicas correspondientes a los picos 1 y 3 se muestran como altamente estables por la presencia de 14 y 16 cisteínas las cuales podrían estar involucradas en la presencia de 7 y 8 puentes disulfuro, en tanto que las fracciones correspondientes a los picos 2, 4 y 5 se trataría de proteínas con la posible formación de tres puentes de sulfuro por la presencia de seis cisteínas.

### 3.3.4 Estudio de Homología Secuencial

Las figuras 19, 21, 23, 25 y 27, muestran los estudios de homología secuencial, por un análisis Bioinformático, usando el software DNASTar (Ver 5.0), de las proteínas 1 al 5 procedente de Chlorophytas filamentosas.

La secuencia del péptido tríptico generado de los picos 1 al 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica, de Chlorophytas filamentosas, es sometido cada péptido, a un análisis de homología secuencial en la base de datos SWISS-PROT: Annotated protein sequence database: <http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl> identificando a las presentes con su respectivo número de acceso, así tenemos que para las secuencias comparadas y ubicadas con homología secuencial para pico 1 tenemos; O82059, P54243 y Q9FXM4; para el pico 2: P50375, P56292 y Q2EEV7; para el pico 3: P52810, Q9LXG1 y Q9FLF0; para el pico 4: P0DJ16, P51413 y Q4KTG9 y para el pico 5: Q4KTG9, P51413 y Q4GXH5; todas ellas mostrando un alto grado de homología secuencial con

secuencias de proteínas procedentes de algas Embryophyta en su mayoría, confirmando la procedencia de las muestras y conservando las características propias de ellas, revelando que se tratan de esa familia de proteínas, disponibles en la base de datos consultada, con la que guarda un alto match o grado de homología secuencial con el péptido tríptico secuenciado por espectrometría de masa (MS/MS).

Los trazos (-), observados corresponden a los generados por el software para el proceso de alineamiento a fin de poder asumir como un proceso de regresión o amplificación génica

### **3.4 Del estudio Bioinformático de las proteínas secuenciadas para establecer su nivel de homología secuencial.**

#### **3.4.1 Caracterización de la estructura primaria de “novo” por espectrometría de masa MS/MS – PICO 1**

La proteína correspondiente al pico 1 procedentes de Chlorophytas filamentosas, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 1 muestra la masa observada de un péptido tríptico, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El péptido secuenciado fue utilizado para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, perteneciendo a la familia de las Embryophytas

Cuadro 10. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis trípica a partir de la proteína 1 de la Chlorophytas filamentosa. La metionina fue modificada por oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Pico</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
<i>Alga Chlorophyta</i>	1	... SAVGVLPLALQYGFEVMDDFLKGANDMDHH...	3289.98

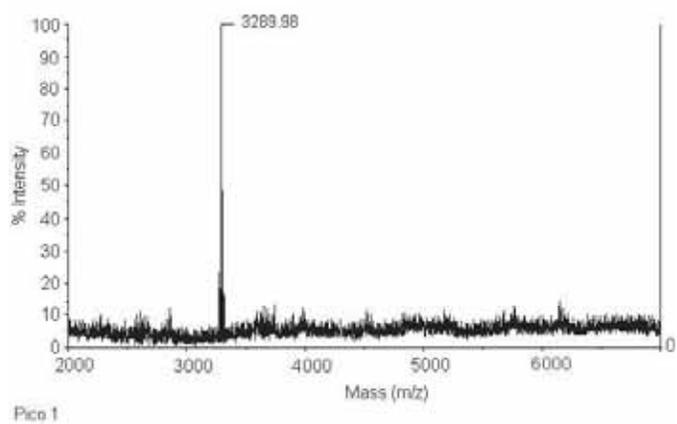


Figura 18. Espectro de masa MS/MS mostrando la masa real del ion crucial (3289.98 Da) y su respectiva secuencia correspondiente a la proteína 1 del alga de Chlorophytas filamentosa.

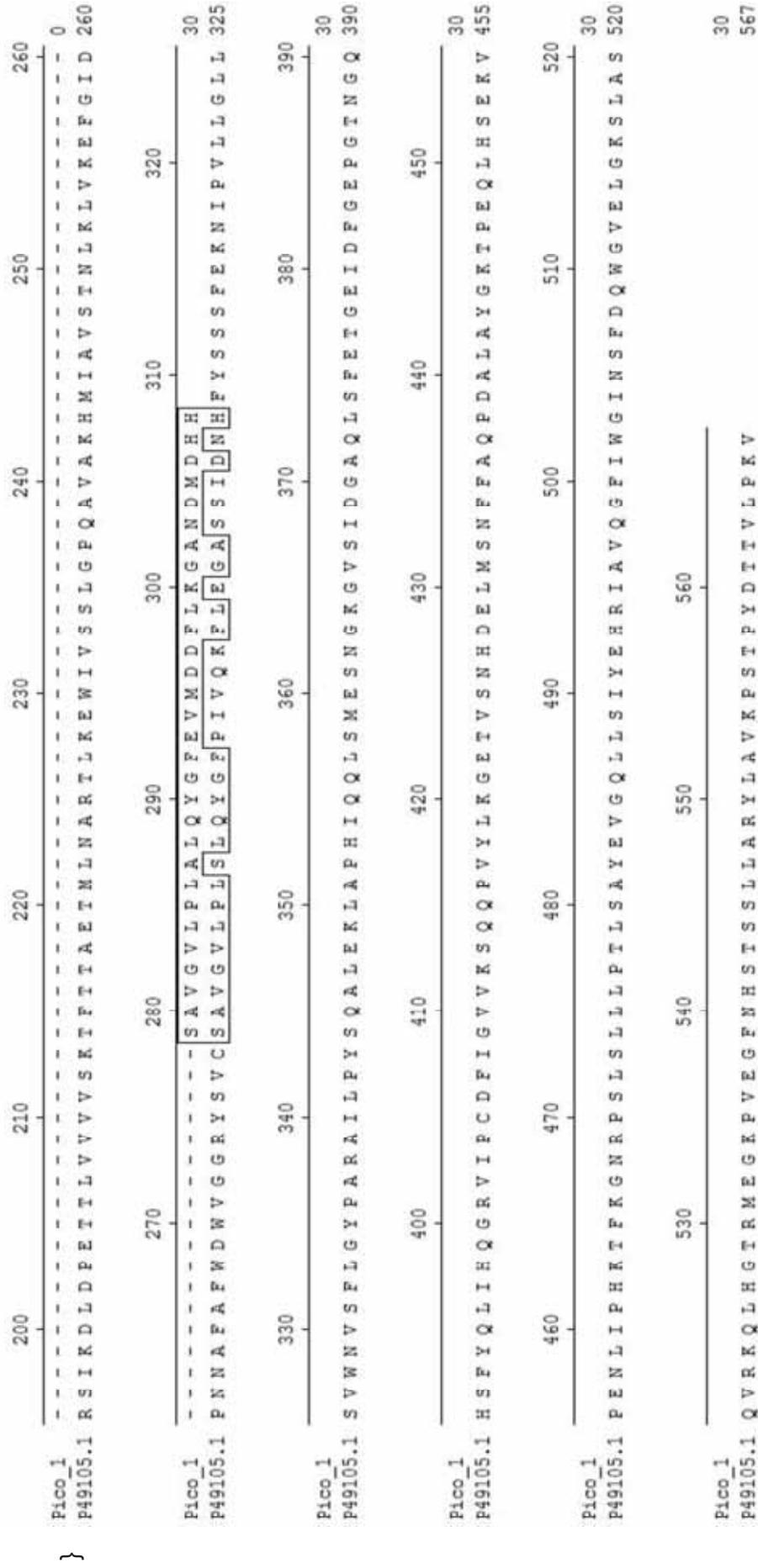


Figura 19. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 1.

### **Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 1.**

La relación de Chlorophytas filamentosas con otras proteínas pertenecientes a varias especies, en especial procedentes de algas Embryophytas como:

- O82059 de *Spinacia oleracea*, (Nowitzki,U., et al., 1998).
- P54243 de *Oenothera sinuata* var. *Hirsuta* (Gottlieb,L.D. and Ford,V.S. 1996).
- Q9FXM4 de *Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* (Kawabe,A., Yamane,K. and Miyashita,N.T. 2000).

<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>.

### **3.4.2 Caracterización de la estructura primaria de “novo” por espectrometría de masa MS/MS – PICO 2.**

La proteína correspondiente al pico 2 procedentes de Chlorophytas filamentosas, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 2 muestra la masa observada de un péptido tríptico, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El péptido secuenciado fue utilizado para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, perteneciendo a la familia de las Embryophytas.

Cuadro 11. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis tróptica a partir de la proteína 2 de la Chlorophytas filamentosa. La metionina fue modificada por oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Pico</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
<i>Alga Chlorophyta</i>	2	... PVIGGSALLALEQFTDNPQLT...	2183.46

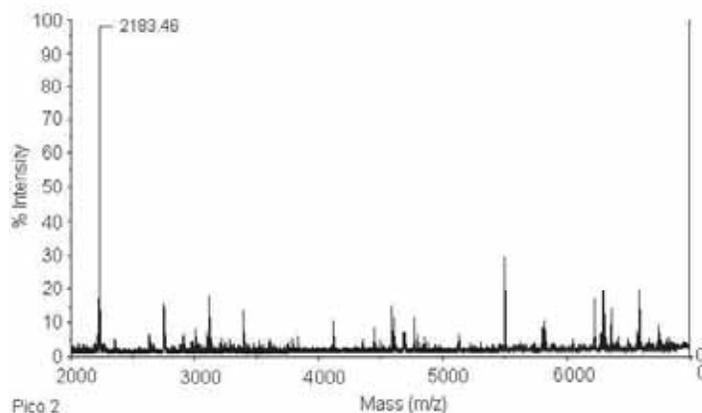


Figura 20. Espectro de masa MS/MS mostrando la masa real del ion crucial (2183.46 Da) y su respectiva secuencia correspondiente a la proteína 2 del alga de Chlorophytas filamentosa.

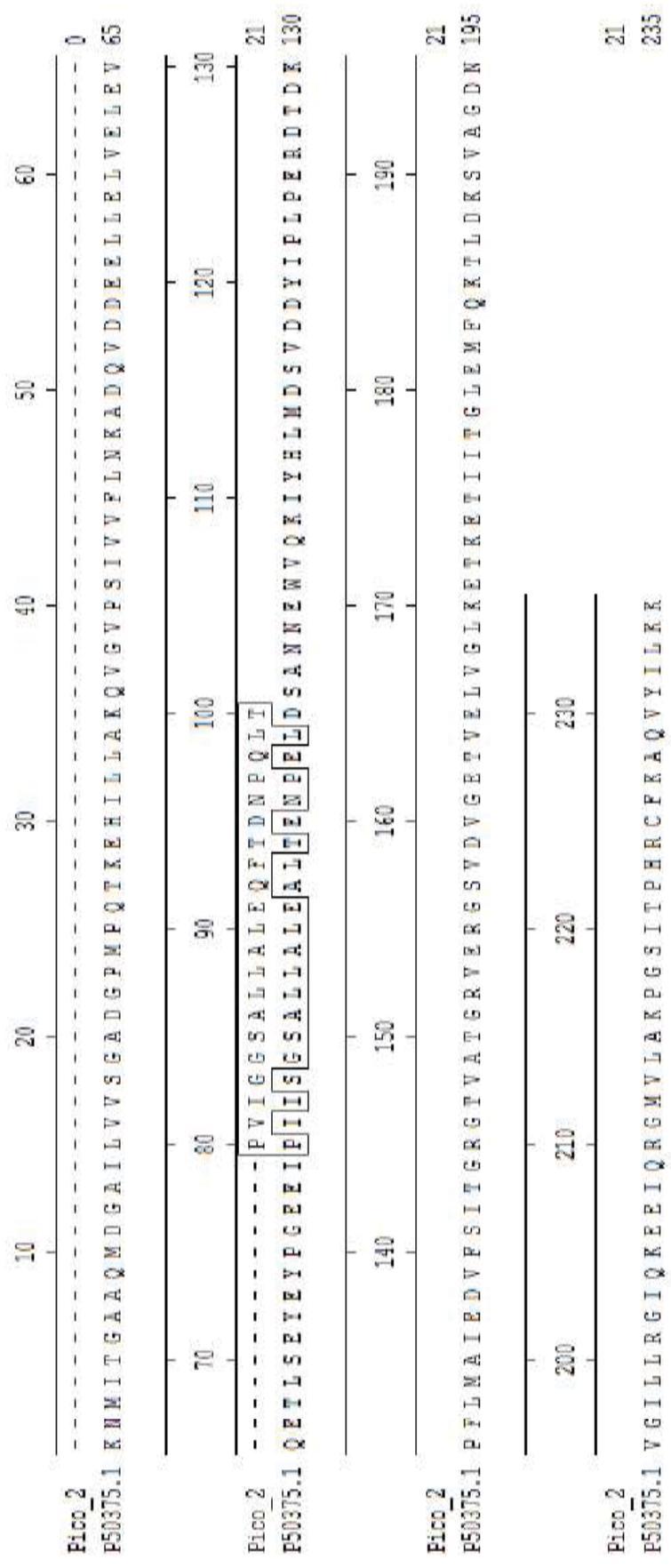


Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 2.

### **Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 2.**

La relación de las Chlorophytas filamentosas con otras proteínas pertenecientes a varias especies, en especial procedentes de algas Embryophyta:

- P50375 de *Derbesia marina*, (Delwiche, et al., 1995).
- P56292 de *Chlorella vulgaris* (Wakasugi et al., 1997).
- Q2EEV7 de *Helicosporidium sp. ex Simulium jonesi* (Tartar and Boucias, 2004).

<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>.

### **3.4.3 Caracterización de la estructura primaria de “novo” por espectrometría de masa MS/MS – PICO 3.**

La proteína correspondiente al pico 3 procedentes de Chlorophytas filamentosas, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 3 muestra la masa observada de un péptido tríptico, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El péptido secuenciado fue utilizado para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, perteneciendo a la familia de las Embryophytas.

Cuadro 12. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis tróptica a partir de la proteína 2 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Pico</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
<i>Alga Chlorophyta</i>	3	... KERPDSSELKLVGEFGLRNKRELWRVQLA...	3366.16

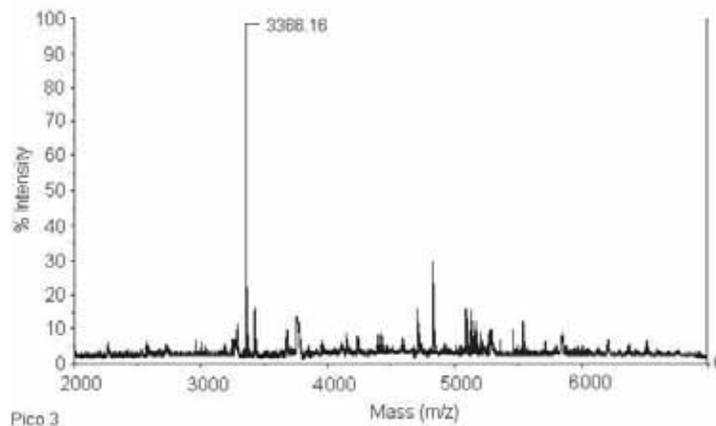


Figura 22. Espectro de masa MS/MS mostrando la masa real del ion crucial (3366.16 Da) y su respectiva secuencia correspondiente a la proteína 3 del alga de Chlorophytas filamentosas.

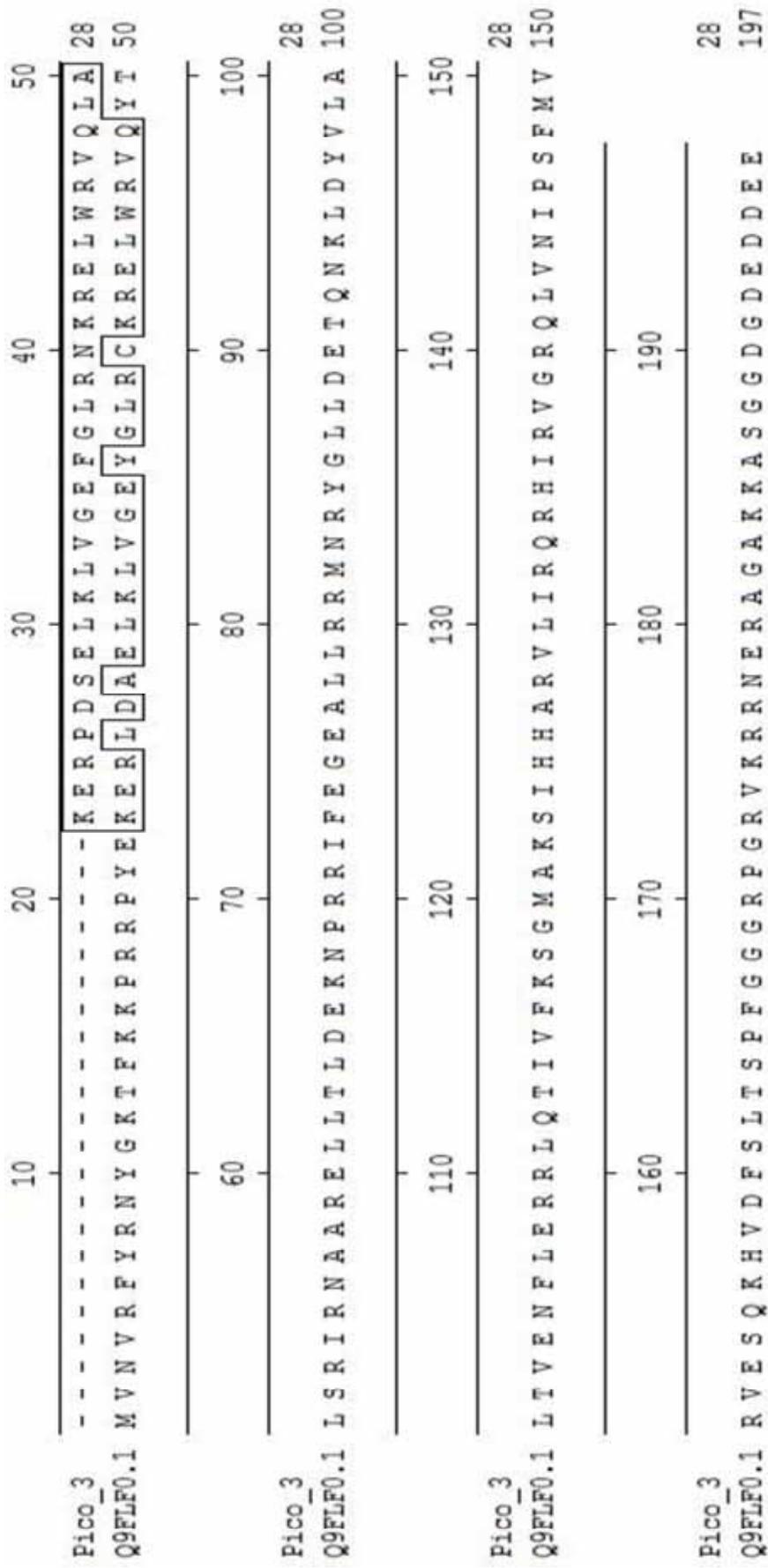


Figura 23. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 3.

### **Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 3.**

La relación de Chlorophytas filamentosas con otras proteínas pertenecientes a varias especies, en especial procedentes de algas Embryophyta:

- P52810 de *Podospora anserina*, (Silar, Koll and Rossignol, 1997).
- Q9FLF0 de *Arabidopsis thaliana* (Sato et al., 1998).
- Q9LXG1 de *Arabidopsis thaliana* (Tabata, 2000).

<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>.

### **3.4.4 Caracterización de la estructura primaria de “novo” por espectrometría de masa MS/MS – PICO 4.**

La proteína correspondiente al pico 4 procedentes de Chlorophytas filamentosas, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 4 muestra la masa observada de un péptido tríptico, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El péptido secuenciado fue utilizado para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, perteneciendo a la familia de las Embryophytas.

Cuadro 13. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis tróptica a partir de la proteína 4 de la Chlorophytas filamentosa. La metionina fue modificada por oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Pico</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
<i>Alga Chlorophyta</i>	4	... DLRVHFKNTRETVKAIHGKNLQEAK...	2932.12

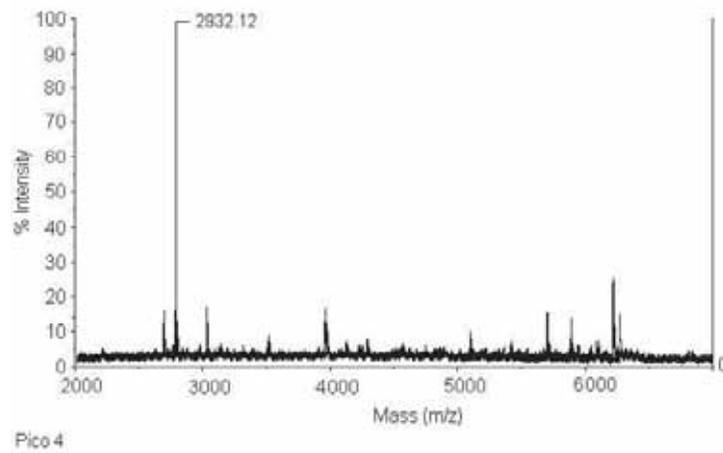


Figura 24. Espectro de masa MS/MS mostrando la masa real del ion crucial (2932.12 Da) y su respectiva secuencia correspondiente a la proteína 4 del alga de Chlorophytas filamentosa.

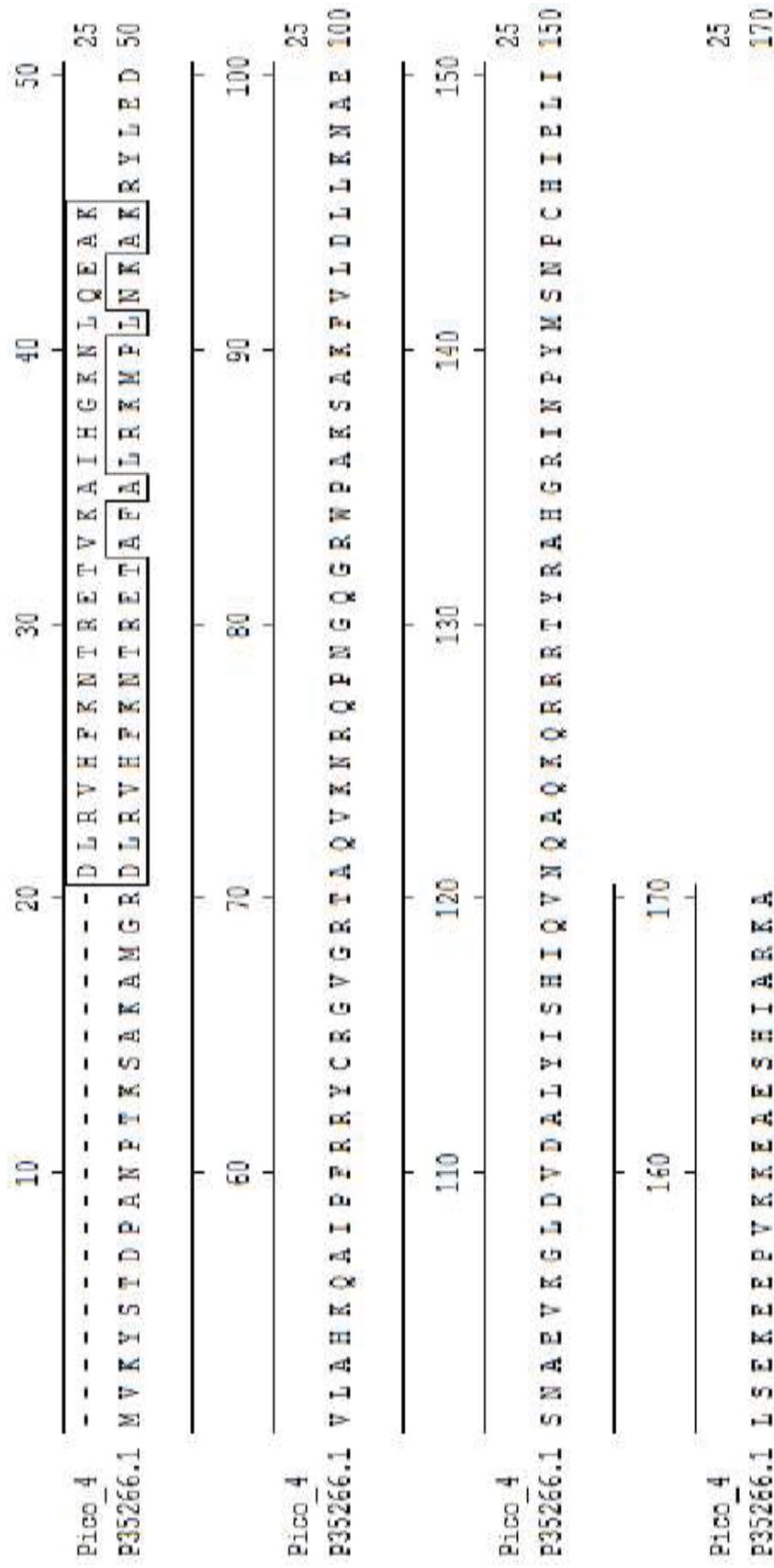


Figura 25. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 4.

#### **Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 4.**

La relación de Chlorophytas filamentosas con otras proteínas pertenecientes a varias especies, en especial procedentes de algas Embryophyta:

- P0DJ16 de *Tetrahymena thermophila* SB210, (Klinge, et al., 2011).
- P51413 de *Arabidopsis thaliana* (Theologis et al., 2000).
- Q4KTG9 de *Suberites domuncula* (Perina, et al, 2006).

<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>.

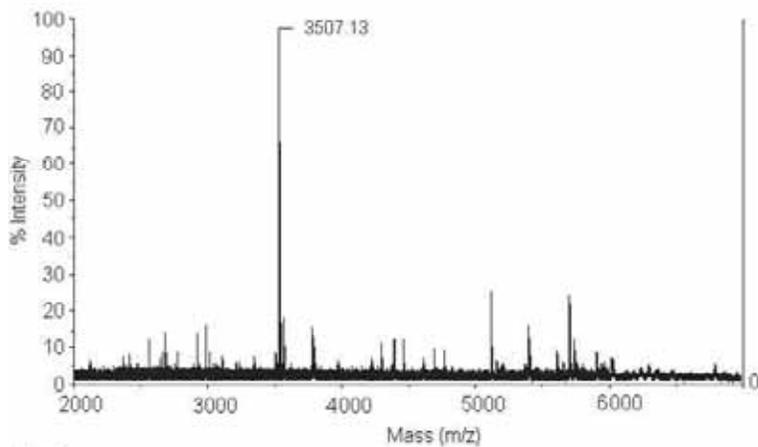
#### **3.4.5 Caracterización de la estructura primaria de “novo” por espectrometría de masa MS/MS – PICO 5.**

La proteína correspondiente al pico 5 procedentes de Chlorophytas filamentosas, fue digerida con tripsina bovina y los péptidos trípticos resultantes fueron secuenciados por espectrometría de masa MS/MS. La tabla 5 muestra la masa observada de un péptido tríptico, así como la secuencia del mismo y su posición en la secuencia deducida.

El péptido secuenciado fue utilizado para hacer la búsqueda en la base de datos del NCBI (BLAST) y fue suficiente para identificar a la familia de proteínas a la que pertenece, con alto match de identidad, perteneciendo a la familia de las Embryophytas.

Cuadro 14. Secuencia de aminoácidos del péptido crucial obtenido por hidrólisis tróptica a partir de la proteína 4 de la Chlorophytas filamentosas. La metionina fue modificada por oxidación.

<i>Muestra</i>	<i>Pico</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Masa (kDa)</i>
<i>Alga Chlorophyta</i>	5	... TCKARGSDLRVHFKNTRETVKAIHGKNLQEA...	3507.13



Pico 5

Figura 26. Espectro de masa MS/MS mostrando la masa real del ion crucial (3507.13 Da) y su respectiva secuencia correspondiente a la proteína 5 del alga de Chlorophytas filamentosas.

```

10      20      30      40      50
Pico_5  - - - - - T C K A R G S D L R V H F K N T R E T - - - - - 19
048557.1 M V K Y S Q E P G N F T K S A K A M G R D L R V H F K N T R E T A F A L R K L E L T K A K R Y L E D 50

60      70      80      90      100
Pico_5  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 19
048557.1 V I A H K Q A I P F R R Y C G G V G R T A Q A K S R H S N G Q G R W P V K S A R F I L D L L K N A E 100

110     120     130     140     150
Pico_5  - - - - - V K A I H G K N L - - - - - - - - - - - - - - - 28
048557.1 S N A D V K G L D V D N L Y V S H I Q V N Q A Q K Q R R R T Y R A H G R I N P Y M S S P C H I E L I 150

160     170
Pico_5  - - - - - - - - - - - - - - - - Q E A - - - - - 31
048557.1 L S E K E E P V K K E A D N I V A A R K Q - - - - - 171

```

Figura 27. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 5.

**Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida de la proteína correspondiente al pico 5.**

La relación de Chlorophytas filamentosas con otras proteínas pertenecientes a varias especies, en especial procedentes de algas Embryophyta:

- Q4KTG9 de *Suberites domuncula*, (Perina, et al., 2006),
- P51413 de *Oenothera sinuata* var. *Hirsuta* (Gottlieb and Ford, 1996) y
- Q4GXH5 de *Arabidopsis thaliana* (Theologis, et al., 2006).

<http://www.expasy.org/cgi-bin/blast.pl>.

## DISCUSIÓN

Acleto et. al (1978) en su estudio sobre Algas continentales, reportó Chlorophytas del departamento de Puno, península de Capachica en el Lago Titicaca identificando a *Cladophora crispata* (*llask'a*) como especie que habita en ríos y lagos limpios, mientras que en la cuenca de Q'esermayo del distrito de Taray de la provincia de Calca, región Cusco, determinamos a *C. glomerata* (*mayulaq'o*) como la especie más abundante existente a lo largo del río Q'esermayo el mismo que es utilizado como planta alimenticia y medicinal por algunos pobladores de la zona, usos que también se evidencian en otras comunidades tanto de la región Cusco como Puno.

Por lo que, hasta el presente, los estudios actuales en algas se centran en la elucidar la presencia del tipo de proteínas presentes, abundancia, la disponibilidad, así como la composición de aminoácidos y las propiedades de estas, se han vuelto indispensables. Nuestros estudios fueron motivados por asuntos de importancia etnobotánica de algas continentales del género *Cladophora*, no estudiadas hasta el presente a nivel mundial, regional y local.

Hasta el presente los estudios sobre la presencia de proteínas presentes en las algas, se han realizado sobre la base de la determinación de proteínas totales, encontrándose así 7.31% p/ps para Chlorophytas marinas como *Ulva rigida* (Fleurence 1999) y *Ulva lactuca* 7.06% p/ps (Wong y Cheung 2000), para las algas pardas (5–15% p/ps) y rojas (10–30% p/ps), respectivamente (Fleurence 1999).

Estas variaciones en el contenido de proteína de algas podrían atribuirse a diferentes factores tales como la especie, las temporadas estacionales, la localización geográfica y las condiciones de almacenamiento (Dawes 1998, Fleurence 1999, Marinho–Soriano *et al.* 2006).

En el presente trabajo se determinó la presencia de proteínas totales alcanzando 12 mg/mL. (12 %), este valor registrado para *Cladophora glomerata*, presente en nuestra región se encuentra en un promedio más alto en comparación con otras algas de importancia en la alimentación humana, lo cual reviste la importancia del presente estudio. Por lo tanto, los estudios realizados de aproximación

proteómica de *Cladophora* de nuestra localidad, parecen ser una fuente potencial de alimento saludable.

En general, las proteínas de algas son ricas en glicina, arginina, alanina y ácido glutámico; contienen aminoácidos esenciales en niveles comparables a los que indica FAO/OMS como requerimientos, sus aminoácidos limitantes son lisina y cistina (Rajapakse N, Kim S. 2011 y Dhargalkar V.K., Verlecar X.N. 2009). Sin embargo, hasta el presente no existe un reporte completo sobre el tipo o cantidad de aminoácidos presentes en cada una de las proteínas presentes en las algas y menos en el tipo de algas continentales. En nuestro trabajo se ha podido determinar la presencia de al menos cinco proteínas presentes en *Cladophora*, cuyas masas moleculares fueron determinadas a través de electroforesis en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), mostrando así las masas siguientes: Pico 1: 96; pico 2: 48; pico 3: 30; pico 5: 22 y pico 4: 15 kDa respectivamente.

Desde una perspectiva nutricional, en *C. glomerata*, se puede deducir los porcentajes de aminoácidos esenciales para la dieta, en el siguiente orden: Pico 2: 66.4%, pico 1: 59.6%, pico 5 58.4% pico 3 55.8% y pico 4: 53.2%. De una forma global podríamos establecer un promedio de 58.68%. Este valor representa porcentualmente un valor considerable que justifica plenamente desde la perspectiva nutricional en el análisis de composición de aminoácidos; una especie de alga continental, candidata de ser considerada como parte de la dieta alimentaria o ser un suplemento nutritivo.

El número de actividades biológicas positivas, incluyendo el valor nutricional de las algas, depende de la naturaleza, cantidad y calidad de proteínas presentes en los extractos de las mismas. Por lo tanto, nuestros resultados, son alentadores desde una perspectiva biotecnológica nutricional al emplear una plataforma tecnológica de punta como es la aproximación proteómica, con el fin de encontrar el tipo y la cantidad presente de proteínas en *Cladophora* como un alimento promisorio del futuro.

## CONCLUSIONES

1. En la Cuenca de Q'esermayo la especie de Chlorophyta de importancia económica por su uso en la alimentación y medicina tradicional corresponde a *Cladophora glomerata* (Linnaeus) Kützing Seattle, alga filamentosa poco ramificada de color verde oscuro el mismo que tiene su hábitat a lo largo del río Q'esermayo abundando en las zonas de agua limpia y calmada.
2. Se ha determinado la presencia de al menos cinco proteínas presentes en *Cladophora glomerata* (L) Kützing Seattle, cuyas masas moleculares encontradas para cada pico fueron:
  - Pico 1: 96 kDa
  - Pico 2: 48 kDa
  - Pico 3: 30 kDa
  - Pico 5: 22 kDa
  - Pico 4: 15 kDaObteniendo una concentración de 12 mg/mL. (12 %) de proteínas totales promedio, considerable en comparación con otras algas de importancia en la alimentación humana.
3. Los porcentajes de aminoácidos esenciales para la dieta presentes en *Cladophora glomerata* (L) Kützing Seattle se encuentran en el siguiente orden: Pico 2: 66.4%, pico 1: 59.6%, pico 5 58.4% pico 3 55:8% y pico 4: 53.2% con un promedio de 58.68% donde destacan la Histidina, Arginina y Lisina, promedio bastante considerable que justifica plenamente el uso tradicional de estas algas como suplemento nutritivo.

## **RECOMENDACIONES.**

- Realizar más estudios de las especies de Chlorophytas filamentosas ya que con el presente trabajo se está demostrando su valor nutritivo.
- Realizar más estudios con el afán de poder realizar cultivos artificiales y ser insertadas en la dieta alimenticia.

## BIBLIOGRAFÍA

ACLETO, C. (1971). *Algas Marinas del Peru de importancia económica*. Lima - Perú.

ACLETO, C. (1978). *Estudio de algas continentales del Perú*. Lima - Perú.

ALDAVE, A. (1971). *Algas marinas para la alimentacion de los Peruanos*. Lima - Perú.

AND, L. (2006). *CARACTERISTICAS GENERALES DE LAS ALGAS*. Obtenido de MONOGRAFAS.COM: <https://www.monografias.com/trabajos14/algas/algas.shtml>

BUSTAMANTE, R. (2011). *PLAN DE GOBIERNO DEL DISTRITO DE TARAY . CUSCO - PERU .*

CANALES. (2007). *PRODUCCIÓN DE Cladophora crispata "LLASKA" EN HÁBITATS DE ZONAS LITORALES DE CCOTOS Y ESCALLANI - CAPACHICA - PUNO*. Obtenido de [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/9589/Roger\\_Oswaldo\\_Poccohuanca\\_Aguilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/9589/Roger_Oswaldo_Poccohuanca_Aguilar.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

CAUSHI, S. (06 de 09 de 2013). *TARAY*. Obtenido de <https://www.scribd.com/document/166099037/TARAY>

CCORY, F. (13 de Marzo de 2019). *DIAGNOSTICO Y ZONAS DE VIDA TARAY*. Obtenido de <https://www.scribd.com/document/401817470/DIAGNOSTICO-Y-ZONAS-DE-VIDA-TARAY>

CORNEJO. (1986). *Evolutionary Pathways and Enigmatic Algae: Cyanidium caldarium (Rhodophyta) and related cells*. Obtenido de [https://books.google.com.pe/books?id=rgPsCAAQBAJ&pg=PA288&lpg=PA288&dq=Cornejo+\(1986\),+ALGAS&source=bl&ots=9vswdKcV\\_B&sig=ACfU3U2zW3v-fri6ntzaecFw1ei9NoHAug&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj8\\_OyK-uPmAhWRE7kGHbp3BcgQ6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=Cornejo%20\(1986\)%2C%20](https://books.google.com.pe/books?id=rgPsCAAQBAJ&pg=PA288&lpg=PA288&dq=Cornejo+(1986),+ALGAS&source=bl&ots=9vswdKcV_B&sig=ACfU3U2zW3v-fri6ntzaecFw1ei9NoHAug&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj8_OyK-uPmAhWRE7kGHbp3BcgQ6AEwAnoECAkQAQ#v=onepage&q=Cornejo%20(1986)%2C%20)

- CUBAS, P. (2008). *Chlorophyta (algas verdes)*. Obtenido de DOCPLAYER: <http://docplayer.es/8931614-Chlorophyta-algas-verdes.html>
- Dawes, F. M.–S. (1998). *Composición química y algunas actividades biológicas de algas marinas recolectadas en Túnez*.
- DRECKMANN, K. (08 de 02 de 2015). *Manual de prácticas de laboratorio Biología de Algas*. Obtenido de <https://www.scribd.com/doc/255124461/Biologia-de-algas>
- EcuRed. (2004). *EcuRed*. Obtenido de ALGA: <https://www.ecured.cu/Alga>
- FAO. (2000). *CULTIVOS ANDINOS SUBEXPLORADOS Y SU APOORTE A LA ALIMENTACION*. Santiago - Chile.
- FUCIKOVA, K. (17 de 10 de 2014). *New phylogenetic hypotheses for the core Chlorophyta based on chloroplast sequence data*. Obtenido de [https://botany.natur.cuni.cz/skaloud/soubory/publikace/2014\\_Fucikova\\_et\\_al.pdf](https://botany.natur.cuni.cz/skaloud/soubory/publikace/2014_Fucikova_et_al.pdf)
- GIL, G. (01 de 2003). *La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/230006458\\_La\\_metodologia\\_proteomica\\_una\\_herramienta\\_para\\_la\\_busqueda\\_de\\_funcion](https://www.researchgate.net/publication/230006458_La_metodologia_proteomica_una_herramienta_para_la_busqueda_de_funcion)
- GRAHAM, B. (2017). *National Human Genome Research Institute*. Obtenido de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Ribosoma>
- GRISALES, L. (25 de 04 de 2017). *Algas: características, tipos o especies representativas*. Obtenido de <https://naturaleza.paradais-sphynx.com/algas/algas-caracteristicas-tipos.htm>
- IBAÑEZ, J. (17 de 03 de 2008). *Algas del suelo (Biomasa del Suelo 3. Algas) (Salvador González Carcedo)*. Obtenido de Un Universo invisible bajo nuestros pies: <https://www.madrimasd.org/blogs/universo/2008/03/17/86823>
- JOSNELL, T. (2009). *Algas - Propiedades dietéticas de las algas*. Obtenido de <https://www.tarot-josnell.com/propiedades-de-los-alimentos/algas.htm>

Kützing. (1843). *Cladophora Kützing, 1843, nom. cons.* Obtenido de [https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus\\_id=37&-session=abv3:44F904F21daa007C40yVi152753B](https://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=37&-session=abv3:44F904F21daa007C40yVi152753B)

LOPEZ, a. (20 de 06 de 2018). *IDENTIFICACION DE ALGAS* . Obtenido de SCRIBD: <https://www.scribd.com/document/382214269/INFORME-micr>

lupillojv. (09 de 04 de 2013). *Origen De Las Plantas Terrestres*. Obtenido de CLUB ENSAYOS: <https://www.clubensayos.com/Ciencia/Origen-De-Las-Plantas-Terrestres/660817.html>

MARTINEZ, C. (2017). *Clasificación de Whittaker de los Seres Vivos (5 Reinos)*. Obtenido de lifeder.com: <https://www.lifeder.com/clasificacion-de-whittaker/>

MENDOZA, L. (05 de 01 de 2017). *SCRIBD*. Obtenido de DIVERSIDAD DE ALGAS OCONAL VILLA RICA OXAPAMPA: <https://www.scribd.com/document/335806074/Mendoza-CI>

MENENDEZ. (2004). *CARACTERISTICAS DE LAS ALGAS*. Obtenido de ASTURNATURA.COM: <https://www.asturnatura.com/algas/caracteristicas-algas.html>

Mish\_chan. (21 de 04 de 2019). *Características de los hongos, protozoarios y algas*. Obtenido de <https://www.scribd.com/presentation/406976434/Caracteristicas-de-los-hongos-protozoarios-y-algas>

NOVELO, E. (02 de 04 de 2012). *CHLOROPHYTA*. Obtenido de <https://docplayer.es/55881990-E-novelo-chlorophyta.html>

ORTIZ, S. (03 de 03 de 2019). *GRUPS MICROBIANOS - Microbiologia 1*. Obtenido de <https://www.scribd.com/document/400974410/GRUPOS-MICROBIANOS-pdf>

P&S. (2012). *Plants & Shrimps*. Obtenido de <http://www.plantsnshrimps.com/alga-verde-filamentosa/>

PALACIOS, M. (2006). *ALGAS BOTANICAS*. Obtenido de MONOGRAFIAS.COM: <https://www.monografias.com/trabajos83/algas-botanicas/algas-botanicas.shtml>

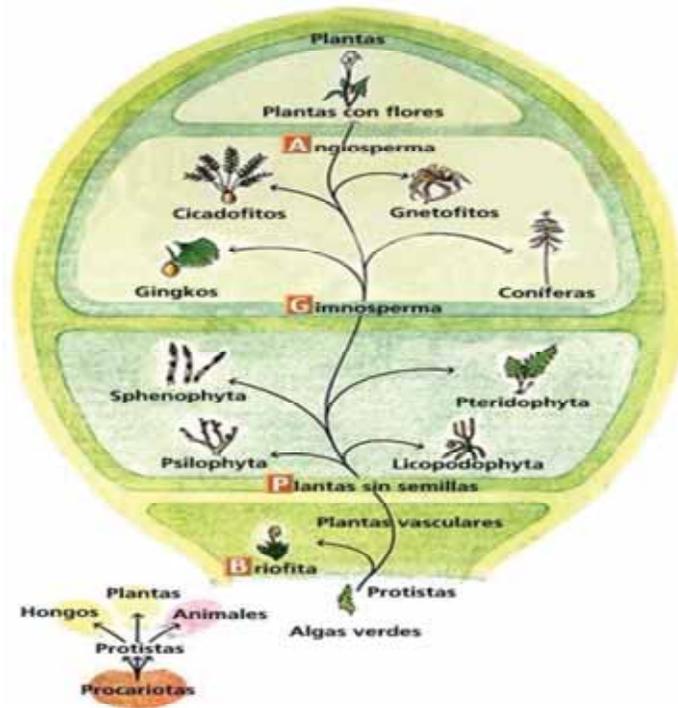
- PUENTE, B. (2009). *Las algas*. Obtenido de <https://www.lineaysalud.com/nutricion/alimentos/las-algas>
- Rajapakse, D. &. (2012). *Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional*. Santiago - Chile.
- RAMOS, R. (2012). *CHLOROPHYTA*. Obtenido de [https://www.academia.edu/7415114/9\\_Chlorophyta](https://www.academia.edu/7415114/9_Chlorophyta)
- SANCHEZ, D. (30 de 05 de 2006). *PLATAFORMAS DE PROTEOMICA*. Obtenido de <https://es.slideshare.net/sliderin21/electroforesis123>
- SEGARTE, F. (2010). *Revision de la clasificación de las Algas*. Obtenido de Apuntes acerca de la utilidad de las algas marinas: [https://www.powershow.com/viewfl/292cfb-ZDc1Z/APUNTES\\_ACERCA\\_DE\\_LA\\_UTILIDAD\\_DE\\_LAS\\_ALGAS\\_MARINAS\\_powerpoint\\_ppt\\_presentation](https://www.powershow.com/viewfl/292cfb-ZDc1Z/APUNTES_ACERCA_DE_LA_UTILIDAD_DE_LAS_ALGAS_MARINAS_powerpoint_ppt_presentation)
- SUMARRIVA, L. (1985). *Evaluación biológica de proteína, vitaminas, minerales y aminoácidos del alga comestible Ulva lactuca "lechuga de mar" del litoral peruano*. Lima - Perú.
- TAXATECA.COM. (s.f.). *ORDER CLADOPHORALES* . Obtenido de <http://www.taxateca.com/ordencladophorales.html>
- UAM, U. A. (09 de 04 de 2014). *electroforesis, Apuntes de Biología*. Obtenido de docsity: <https://www.docsity.com/es/electroforesis-7/2854874/>
- UPM, U. P. (2008). *Técnicas Básicas de Proteómica*. Obtenido de STUDOCU: <https://www.studocu.com/es/document/universidad-politecnica-de-madrid/biologia/apuntes/proteomica/5167071/view>
- Whittaker. (s.f.). *lifeder.com*. Obtenido de Clasificación de Whittaker de los Seres Vivos (5 Reinos): <https://www.lifeder.com/clasificacion-de-whittaker/>

## ANEXOS

### ABREVIATURAS

<b>aa</b>	: aminoácido
<b>cm</b>	: centímetro
<b>g</b>	: gramo/gravedad
<b>h</b>	: hora
<b>HCl</b>	: ácido clorhídrico
<b>HPLC</b>	: cromatografía líquida de alta precisión
<b>kDa</b>	: kilodalton
<b>Kg</b>	: kilogramo
<b>Log</b>	: logaritmo
<b>mL</b>	: mililitro
<b>mm</b>	: milímetro
<b>mM</b>	: milimolar
<b>Mm</b>	: masa molecular
<b>msnm</b>	: metros sobre el nivel del mar
<b>MALDI-TOF</b>	: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation- Time of Flight
<b>NaOH</b>	: hidróxido de sodio
<b>nm</b>	: nanómetro
<b>p.ej.</b>	: por ejemplo
<b>p/v</b>	: peso por volumen
<b>PAGE</b>	: electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pH</b>	: logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
<b>PICO-TAG</b>	: analizador automático de aminoácidos
<b>PITC</b>	: fenilisotiocianato
<b>SWISS-PROT</b>	: banco de datos de secuencias proteicas
<b>SDS</b>	: dodecil sulfato de sodio
<b>TFA</b>	: ácido trifluoracético
<b>µg/mL</b>	: microgramo por mililitro
<b>uL</b>	: microlitro
<b>v/v</b>	: volumen por volumen

Diagrama que ilustra la más probable relación filogenética existente entre las Chlorophytas y el Reino Plantae (sw\_educ/biologia/bio100/html)





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

Av. de la Cultura 722  
Pabellón C - Of. 106

Apartado Postal 921 - Cusco Perú  
Teléfono - fax - modem: 224831

**UNIDAD DE PRESTACIONES DE SERVICIO DE ANALISIS QUIMICO**  
**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE QUIMICA**  
**INFORME DE ANALISIS**

Nº0711-14-LAQ

SOLICITANTE: FERNANDO ORELLANO TUERO

MUESTRA : Cladophora sp

FECHA : C/17/11/2014

RESULTADO ANALISIS FISICOQUIMICO:

=====

Humedad %	92.85
Proteina %	1.39
Grasa %	0.84
Ceniza %	0.56
Fibra %	4.10
Carbohidratos %	4.36

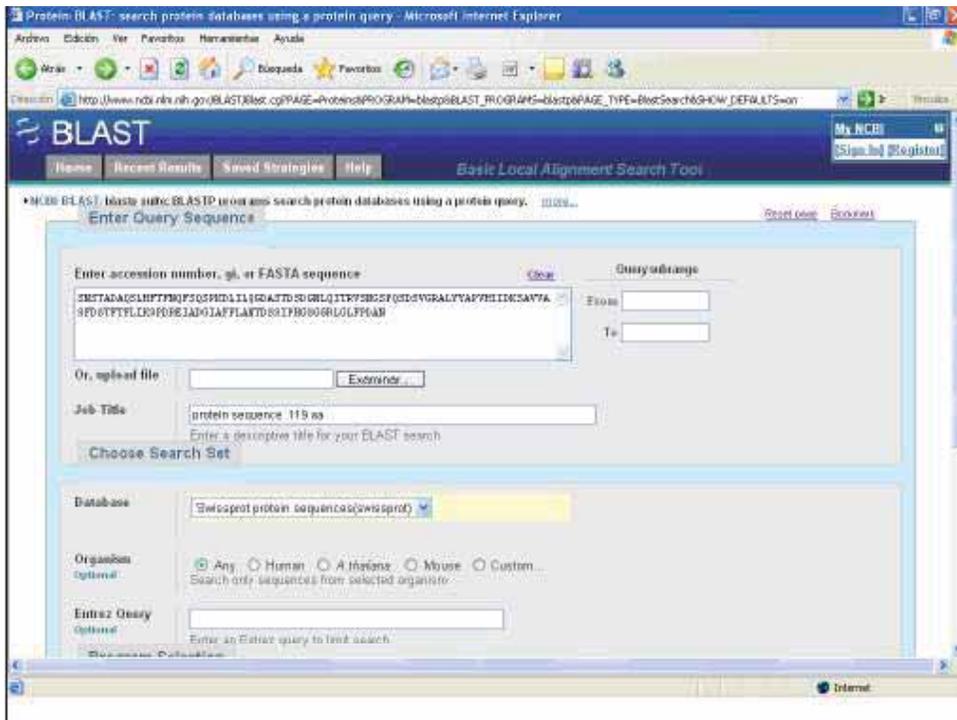
=====

Cusco, 21 de Noviembre 2014

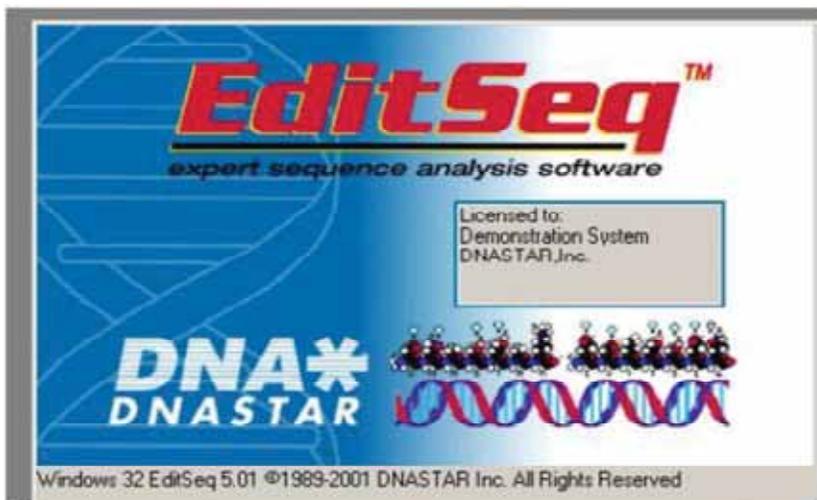


Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco  
Unidad de Prestación de Servicios Analíticos  
*[Signature]*  
Mecquindos Méndez Arce  
RESPONSABLE DEL LABORATORIO  
DE ANALISIS QUIMICO

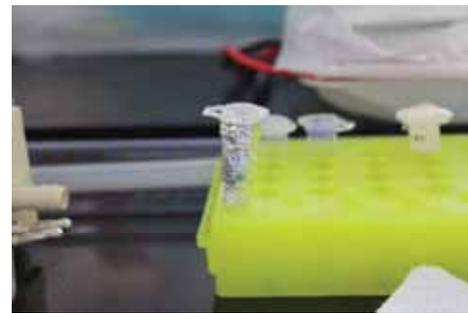
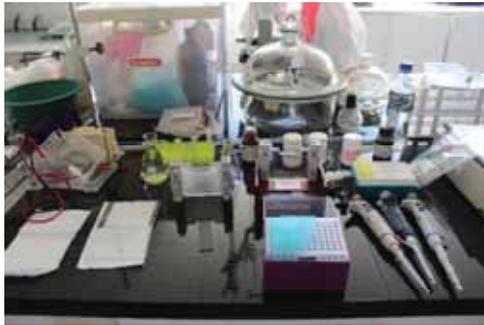
Base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) utilizado para el estudio de homología secuencial



Programa DNASTAR (EditSeq) 5.01 utilizado para el alineamiento de la estructura primaria en comparación con otras secuencias de la base de datos BLAST.



Determinación de los pesos moleculares de la muestra problema realizado en la Universidad San Agustín de Arequipa





Campinas, 03 de Noviembre del 2015.

## DECLARACION

Declaro para los debidos fines que hemos ejecutado las siguientes técnicas en química de proteínas, relacionado al Proyecto: Chlorophytas filamentosas de importancia económica en la cuenca de Quesermayo - distrito de TARAY - CALCA – CUSCO – PERU 2015: Una aproximación Proteómica Funcional. Proyecto de Tesis del Sr. Alain Fernando Orellano Tuero; el mismo que fue ejecutado sobre mi responsabilidad en las técnicas indicadas:

- 1- Determinación de proteínas totales (Método de Biuret).
- 2- Determinación de la curva estándar de proteínas.
- 3- Determinación de proteínas de la muestra problema.
- 4- Cromatografía líquida de interacción hidrofóbica en mini columnas HiTRAP.
- 5- Electroforesis en SDS-PAGE.
- 6- Análisis de Composición de Aminoácidos (Sistema Pico – Tag).
- 7- Estudio de Homología Secuencial y Análisis Bioinformático.

Atentamente,

Prof. Dr. Luis Alberto Ponce Soto  
Pesquisador Colaborador Voluntario - Laboratorio de Química de Proteínas  
Departamento de Bioquímica/IB/UNICAMP