

**PRODUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA
Haematococcus pluvialis BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE ESTRÉS EN MEDIOS DE
CULTIVO BBM Y RM.**

**PRODUCTION AND EXTRACTION OF ASTAXANTHIN FROM MICROALGAE
Haematococcus pluvialis UNDER DIFFERENT STRESS CONDITIONS IN BBM AND RM
CULTURE MEDIA.**

***Nieto Rodríguez María Mónica^{1*}, Trujillo Montaña María Camila², Lancheros Díaz Ana
Graciela³**

¹Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la salud, Programa Bacteriología y laboratorio clínico. Grupo de Investigación Semillero Bioprocesos y control. Calle 28 # 7, *Correo electrónico: mariamonica1908@gmail.com. Teléfono: 3025454021, Bogotá D.C, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-6144-788X>

²Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la salud, Programa Bacteriología y laboratorio clínico, Grupo de Investigación Semillero de investigación Bioprocesos y control. Calle 28 # 7, Correo electrónico: mcamilatrujillo@unicolmayor.edu.co. Telefono: 3112763310, Bogotá D.C, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-4138-7647>

³Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de ciencias de la salud, Programa de Bacteriología y laboratorio clínico, Grupo de investigación Semillero de investigación Bioprocesos y control. Calle 28 # 7, Correo electrónico: aglancheros@unicolmayor.edu.co. Telefono: 3005052417, Bogotá D.C, Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5799-0282>

RESUMEN

Las microalgas son fuente importante de compuestos bioactivos útiles a nivel industrial, ejemplo de ello la astaxantina, un pigmento carotenoide natural conocido por sus propiedades benéficas y su potencial síntesis en la microalga *Haematococcus pluvialis*. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo principal evaluar la producción y extracción de astaxantina mediante dos ensayos utilizando medios de cultivo diferentes los cuales fueron el medio BBM modificado y medio RM inoculados con la cepa de

Autor a quien debe dirigirse la correspondencia *María Mónica Nieto Rodríguez. E-mail: mariamonica1908@gmail.com

1
2
3

***Nieto Rodríguez María Mónica^{1*}, Trujillo Montaña María Camila², Lancheros Díaz Ana
Graciela³**

referencia UA de *H. pluvialis* bajo condiciones de estrés específicas que fueron clave para la producción del carotenoide, en donde se incluye la adición de acetato de sodio a una concentración de 1,6g/L a los 22 días de cultivo, la extracción de astaxantina utilizando aceite de soja/etanol, la cuantificación de astaxantina y clorofila por espectrofotometría y finalmente se llevó a cabo el análisis estadístico ANOVA. Al finalizar ambos ensayos se concluyó que la producción de astaxantina en la microalga fue mayor en el medio BBM suplementado con acetato de sodio en comparación con la producción en el medio RM no suplementado siendo la producción de 34,01 ug/ml y 25,74 ug/ml respectivamente. Así mismo, se determinó que la extracción de astaxantina mediante el método de disolución con aceite de soja/etanol es una técnica viable, sostenible, económica, y podría ser de gran interés para investigaciones futuras y para su aplicación en procesos industriales relacionados con la producción de astaxantina.

Palabras clave: Acetato de sodio; aceite de soja; astaxantina; factores de estrés; *Haematococcus pluvialis*.

ABSTRACT

Microalgae are an important source of bioactive compounds useful at an industrial level, an example of this is astaxanthin, a natural carotenoid pigment known for its beneficial properties and its potential synthesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. The main objective of this research work was to evaluate the production and extraction of astaxanthin through two tests using different culture media which were the modified BBM medium and RM medium inoculated with the reference strain UA of *H. pluvialis* under specific stress conditions that were key for the production of the carotenoid, which includes

***Nieto Rodríguez María Mónica^{1*}, Trujillo Montaña María Camila², Lancheros Díaz Ana Graciela³**

the addition of sodium acetate at a concentration of 1,6 g / L after 22 days of culture, the extraction of astaxanthin using soybean oil / ethanol, the quantification of astaxanthin and chlorophyll by spectrophotometry and finally the ANOVA statistical analysis was carried out. At the end of both tests, it was concluded that the production of astaxanthin in the microalgae was higher in the BBM medium supplemented with sodium acetate compared to the production in the non-supplemented RM medium, with production of 34,01 ug/ml and 25,74 ug/ml respectively. Likewise, it was determined that the extraction of astaxanthin using the soybean oil/ethanol dissolution method is a viable, sustainable, and economical technique, and could be of great interest for future research and for its application in industrial processes related to the production of astaxanthin.

Key words: Astaxanthin; *Haematococcus pluvialis*; sodium acetate; soybean oil; stress factors

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos de alta importancia a nivel industrial debido a su gran biodiversidad y variedad de aplicaciones en todo el mundo; utilizadas comúnmente en la producción de biodiesel, procesos de biorremediación de aguas residuales, obtención de proteínas de tipo alimenticio, usos en acuicultura y avicultura (Ramírez, 2013). Esto es posible gracias a la capacidad de las microalgas para crecer rápidamente en cultivos líquidos, su resistencia a condiciones extremas, la

habilidad que tienen para sintetizar y liberar ciertos metabolitos como lo son ácidos grasos y pigmentos como los carotenoides, y su gran potencial a nivel genético, características que las hacen altamente atractivas en el ámbito de la biotecnología (García *et al.*, 2017).

El carotenoide de interés en este proyecto de investigación fue la astaxantina, un antioxidante natural y pigmento de color rojizo perteneciente a la familia de las

***Nieto Rodríguez María Mónica^{1*}, Trujillo Montaña María Camila², Lancheros Díaz Ana Graciela³**

xantofilas, serie fitoquímica de los terpenos y de estructura química liposoluble encontrada en microalgas como *Haematococcus pluvialis*, levaduras como *Xanthophyllomyces dendrorhous*, algunos peces, crustáceos y plumas de aves. Siendo *Haematococcus pluvialis* quien presenta mayor potencial de producción a nivel industrial bajo condiciones significativas de estrés aprovechando la energía lumínica y capturando el CO₂ de la atmósfera (Córdoba, 2015). Esta microalga unicelular verde dulceacuícola es perteneciente al filo *Chlorophyta*, orden *Volvocales*, familia *Haematococcaceae* y dentro de sus propiedades puede llegar a acumular hasta el 5,02 % de astaxantina en célula seca, se describe como un alga de forma elíptica a circular con un tamaño que oscila entre 8-50 µm dependiendo de su estadio en el ciclo de vida (Alcaraz y Gilabert, 2018).

Bajo estas consideraciones, la microalga *Haematococcus pluvialis* es una de las mejores fuentes naturales para obtener astaxantina pero para poder utilizarla de manera productiva a nivel industrial requiere de condiciones específicas controladas que estimulen el crecimiento y la producción del carotenoide como lo son la intensidad lumínica, periodos de luz/oscuridad, temperatura adecuada, estrés salino, agitación constante y deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo, sin

embargo, su crecimiento es lento y su ciclo de vida es complejo ya que tiene diferentes formas celulares que van desde la célula vegetativa hasta la aplanospora que varía de acuerdo a los factores de estrés aplicados siendo esta última muy importante ya que es ahí donde se encuentra la astaxantina (Córdoba, 2015).

La astaxantina obtenida de *Haematococcus pluvialis* tiene un interés significativo a nivel industrial debido a los numerosos beneficios que brinda para la salud humana y animal entre ellos se destaca su efectiva bioactividad antiinflamatoria y antioxidante respaldada por evidencia científica ya existente, como la protección contra el daño celular, reducción en procesos inflamatorios, mejora considerable de la salud cardiovascular, ocular, metabólica y la prevención contra distintos tipos de cáncer por su capacidad de eliminar los radicales libres del cuerpo (López y Mach, 2012).

Concretamente, la demostración científica se basa en estudios realizados en modelos in vivo e in vitro los cuales confirman que la astaxantina y los ésteres que posee dentro de la estructura química muestran actividades biológicas potenciales en modelos animales, sin embargo, falta investigación de las vías metabólicas en sistemas biológicos, la comprensión de los efectos específicos de la ingestión de

astaxantina en la salud humana y por lo tanto, se requieren estudios adicionales para determinar con mayor precisión su impacto, seguridad y eficacia en el uso directo como suplemento dietario (Ambati et al., 2014). Sin embargo, es relevante destacar que la Comisión Europea aprobó el uso de astaxantina derivada de *Haematococcus pluvialis* en suplementos alimenticios, estableciendo un límite máximo de 8 mg diarios de astaxantina. (Silva et al., 2020). Un dato relevante es que la primera autorización para el uso de astaxantina en suplementos alimenticios fue otorgada en Suecia en el año 1995, antes del 15 de mayo de 1997, cuando comenzó a aplicarse el primer reglamento de ejecución sobre nuevos alimentos en la Unión Europea (Turk et al., 2020).

De acuerdo con lo previamente señalado, a lo largo de los años se han descrito distintas metodologías para la extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* basadas en el uso de solventes orgánicos altamente tóxicos y perjudiciales para el medio ambiente y el personal de laboratorio como por ejemplo el uso de fluidos supercríticos. Henriques et al., (2007), llevaron a cabo su estudio utilizando un proceso de disrupción celular mediante el uso de disolventes como la acetona, etanol y metanol, donde la microalga cultivada se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, se

eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2 mL de agua destilada para eliminar todos los residuos de sal provenientes del medio de cultivo, posteriormente en el solvente se sometieron a agitación vigorosa en vórtex durante 15 segundos concluyendo que el metanol y el etanol son los más efectivos para generar ruptura celular, facilitando así la liberación de los carotenoides y permiten su cuantificación por espectrofotometría.

En el año 2011 se estudió el proceso de extracción de astaxantina de *H. pluvialis* desde medios acuosos usando dióxido de carbono supercrítico, efectos de presión y temperatura cuyos resultados indicaron que la presencia de agua del medio genera un retardo en el inicio del proceso de extracción dando origen a curvas de extracción con forma sigmoideal, se reduce la solubilidad de astaxantina y otros compuestos del extracto requiriendo altos niveles de CO₂ (Aravena, 2011). Por otra parte, las investigaciones sobre la extracción de astaxantina realizadas por Xiaohui et al., (2015), refieren una comparación entre 3 diferentes métodos de extracción con acetona, etanol y aceite de soja, en el cual, dentro del procedimiento principal utilizaron 0,5 mg de alga seca en ocho tubos de laboratorio y les añadieron 1 ml de acetona, 0,5 mL de etanol y 1 mL del aceite, dos tubos por cada solvente y los centrifugaron para asegurar la extracción

completa de la astaxantina. Posteriormente, los ocho tubos se dejaron en un baño de agua fría y se sometieron a bajas temperaturas con hielo; el extracto se centrifugó y el sobrenadante se recolectó para transferir a tubos de ensayo limpios y poder calcular el contenido de astaxantina por medio de espectrofotometría concluyendo que el método más eficaz para la extracción de astaxantina es utilizando acetona en conjunto con aceite de soja.

En relación a las distintas condiciones de producción de astaxantina, Niño y colaboradores hicieron la comparación en tres medios de cultivo (BBM modificado, OMH y RM) con factores de estrés controlados en cuanto a cantidad de biomasa obtenida y por ende mayor producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*, pero teniendo en cuenta que el inóculo fue realizado en medio Volvox y los datos de crecimiento obtenidos fueron registrados en una cinética de crecimiento donde el medio RM presentó un recuento de $7,55 \times 10^5$ células/ml, seguido del medio de cultivo BBM con $3,88 \times 10^5$ células/ml, y el medio de cultivo OHM con un recuento de $3,43 \times 10^5$ células/ml (Niño *et al.*, 2017).

En contraste con lo anterior; Lancheros *et al.*, (2021), realizaron la producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando

un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L con medio de cultivo RM, pH 6,8, temperatura 20°C, iluminación con lámparas blancas a tiempos de 20h luz/4h oscuridad, diferentes concentraciones de acetato de sodio y cloruro de sodio para posteriormente determinar crecimiento celular, cambios morfológicos y cuantificación de astaxantina y clorofila por espectrofotometría; esto dió como referencia y punto de partida que el uso de biorreactores en el proceso de generación de biomasa y concentración celular es clave para generar esas condiciones significativas de estrés que posteriormente permiten la maduración en el ciclo de vida del microorganismo y así mismo la producción de astaxantina.

Molino *et al.*, (2018) investigaron la extracción de astaxantina y luteína de *Haematococcus pluvialis* en la fase roja utilizando la técnica de fluidos supercríticos (CO₂), y usando etanol como disolvente; allí se evaluaron factores de temperatura (50–80 °C) y la presión (100–550 bar) sobre la recuperación y pureza del extracto durante el tiempo aplicado que variaba de 20 a 80 minutos, es decir en cuatro ciclos de extracción de 20 minutos cada uno. Finalmente, se mantuvieron constantes las velocidades de flujo de dióxido de carbono y etanol, en donde obtuvieron como resultado un rendimiento de extracción de astaxantina del 92% a una temperatura de 65°C siendo

esta la temperatura ideal para evitar la degradación térmica del pigmento, adicional a esto justifican el uso de CO₂ al ser un solvente extractante menos inflamable y menos tóxico que los usados en otras investigaciones como el hexano, butano u óxido nitroso, y adicional a esto es capaz de propagarse mucho más rápido a través de las paredes celulares gracias a su alta permeabilidad y difusividad.

Adicionalmente, Gómez *et al.*, (2019) plantearon como objetivo de investigación determinar y evaluar la producción de astaxantina y la expresión de los genes relacionados con su biosíntesis bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno, alta irradiancia, pH, ciclo de luz/oscuridad, temperatura, agitación constante e iluminación de lámparas blancas en un medio de cultivo RM, en donde concluyeron que la aplicación de estas condiciones de estrés condujeron a un significativo aumento en la concentración de astaxantina independientemente de los diferentes tratamientos utilizados en el estudio.

Como resultado del estudio de antecedentes, se planteó como objetivo del proyecto de investigación realizar un análisis comparativo entre dos medios ideales para la producción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*, determinando cuál

era el más productivo y posterior a ello realizar la extracción del pigmento con la metodología de dilución con aceite de soja y etanol demostrando su efectividad, siendo así, una investigación que contribuye al avance científico, a la industria y es clave como punto de partida para investigaciones futuras que vean la producción de astaxantina como una propuesta a nivel industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación es de tipo experimental y de carácter mixto con enfoque en un proceso investigativo cualitativo y cuantitativo; alcance exploratorio, explicativo, descriptivo y adicionalmente de tipo longitudinal por la implicación del seguimiento de la cepa de *Haematococcus pluvialis* a lo largo del tiempo, comparando 2 ensayos en los medios de cultivo BBM modificado y RM para determinar crecimiento, cambio morfológico, desarrollo y eficaz producción de la microalga y el caroteno astaxantina bajo diferentes condiciones de estrés para su posterior extracción con aceite de soja y etanol.

Microorganismo

La muestra utilizada en esta investigación fue la cepa de referencia UA de la microalga *Haematococcus pluvialis* suministrada por la Universidad de Antioquia, Colombia para el

semillero de investigación Bioprocesos y control de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Preparación del inóculo

El inóculo inicial para llevar a cabo la realización de ambos ensayos se preparó activando la cepa de referencia UA de *Haematococcus pluvialis* en 300 ml de medio de cultivo Volvox durante un tiempo de 21 días a 25°C y agitación manual una vez al día; este medio de cultivo es una mezcla de nutrientes diseñados para proporcionar las condiciones adecuadas de crecimiento a las algas, en particular las especies que requieren una fuente de carbono orgánico o que pueden beneficiarse de él, ver tabla 1. En esta etapa se determinó en microscopio la viabilidad y pureza de la cepa en el medio de cultivo, analizando el crecimiento celular de la microalga a través de recuentos celulares en cámara de Neubauer hasta obtener el conteo mínimo necesario en el ensayo que es de $1,0 \times 10^4$ células/ml y transferir una proporción al 10% en 10 medios de cultivo previamente esterilizados, con un pH ajustado al 6,8; intensidad lumínica de $70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ con lámparas fluorescentes blancas de marca Philips con tiempos de 18 horas luz/6 oscuridad y agitación manual una vez por día.

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo Volvox.

Componentes	Cantidad (mg/L)
NaNO ₃	25 mg/L
KH ₂ PO ₄	75 mg/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	25 mg/L
CaCl ₂	25 mg/L
KCl	50 mg/L
FeSO ₄	0.002 mg/L
MnSO ₄	0.002 mg/L

Fuente: Autores

Medios de cultivo y condiciones

Se usaron por cada ensayo 10 matraces Erlenmeyer previamente esterilizados en autoclave a las que se les agregó el inóculo mencionado anteriormente y 100 ml de medio de cultivo BBM modificado (ensayo 1) y RM (ensayo 2); dentro de estos se incluye el control positivo y negativo por ensayo, siendo los controles positivos los que tienen adición de acetato de sodio mientras que los controles negativos los que no lo tienen. Estos medios de cultivo tienen como característica principal su alto contenido de sales lo que permite que la microalga crezca satisfactoriamente bajo las condiciones necesarias tal como se observa en las tablas 2 y 3. Es importante aclarar que todos los medios de cultivo se prepararon bajo condiciones estrictas de calidad como lo fueron el uso de todos los reactivos necesarios para su preparación incluido el uso de agua destilada, uso de una balanza analítica electrónica y calibrada para medir con precisión cada uno de los componentes del medio de cultivo, se realizó el ajuste de pH a 6,8, se esterilizaron los medios de

cultivo a 121°C para posteriormente servirlos y almacenarlos en un lugar fresco, seco y oscuro; para finalizar se etiquetan todas las matraces con nombre, fecha de preparación y cantidad, lo anterior con el fin de cumplir con los objetivos del ensayo.

Esta etapa se centró en el crecimiento de la microalga, el análisis del cambio morfológico dentro de su ciclo de vida y la producción de astaxantina; por lo tanto, se garantizaron como condiciones el ajuste de pH, factores de estrés como la intensidad lumínica blanca con tiempos de 20 horas luz/ 4 oscuridad, agitación manual una vez al día todos los días, temperatura de 20°C, deficiencia de nitrógeno al 5% en el ensayo 1 (BBM modificado) y adición de acetato de sodio a una concentración de 1,6g/L a partir de los 22 días de cultivo.

Tabla 2 y 3. Composición química del medio de cultivo BBM y RM.

Componentes	Cantidad (g/L)	Componentes	Cantidad (g/L)
NaNO ₃	0.25 g/L	NaNO ₃	2.125 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g/L	KH ₂ PO ₄	0.2041 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.025 g/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.7394 g/L
K ₂ HPO ₄	0.075 g/L	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.0735 g/L
KH ₂ PO ₄	0.175 g/L	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0278 g/L
NaCl	0.025 g/L	EDTA-Na ₂	0.0372 g/L
Oligoelementos EDTA-Na ₂ FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.050 g/L 0.00498 g/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.00198 g/L
Solución de oligoelementos (micronutrientes traza).		ZnCl ₂	0.00136 g/L
H ₃ BO ₃	11.42 mg/mL	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.82 mg/mL	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00024 g/L
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.44 mg/mL	CoCl ₂	0.000013 g/L
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.71 mg/mL		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 mg/mL		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.49 mg/mL		

Fuente: Autores

Análisis de crecimiento y estadio evolutivo de *H. pluvialis*

El análisis de crecimiento de la microalga en cada uno de los ensayos se realizó tomando aproximadamente cada 7 días 1 muestra de 250 uL con pipeta manual, la cual se dispensó entre la cámara de Neubauer y una laminilla portaobjetos para ver en microscopio óptico 40X, si existía algún cambio morfológico en la microalga y realizar los recuentos celulares por duplicado en la cámara; posterior a los 22 días de cultivo con la adición de acetato de sodio el muestreo se realizó tomando dos muestras de los cultivos organizados numéricamente por día las cuales fueron monitoreadas a lo largo del tiempo hasta el último día del ensayo, cabe aclarar que a las muestras altamente concentradas se les realizó diluciones en proporción 1:10 y 1:100 con agua destilada para hacer efectivo el análisis y el registro de datos.

Determinación de la concentración de clorofila y astaxantina

Posterior a la realización de los recuentos celulares, se realizaron las curvas de calibración para cada analito a analizar (clorofila y astaxantina) y en el espectrofotómetro Jemway modelo 6405 se obtuvieron las absorbancias de los analitos a emisiones de 667 nm y 475 nm respectivamente. El muestreo de cada medio del ensayo para la cuantificación se realizó

extrayendo 1 ml de la suspensión celular en tubos que se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos en centrífuga Eppendorf 5702, posteriormente, se añadió 1 ml de metanol a los tubos, seguido de una incubación de 10 minutos en baño serológico a 60°C y finalmente se cuantificó las concentraciones en ug/ml (Lancheros *et al.*, 2021)

Extracción de astaxantina con disolución en aceite de soja y etanol

Esta metodología de extracción está basada en la separación de componentes por liposolubilidad siendo esta una de las características químicas más importantes de la astaxantina. El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se organizaron los medios de cultivo por ensayo y por grupo dependiendo si estaban suplementados con el tratamiento de acetato de sodio o no, se agitaron de forma manual y el contenido celular de cada uno de los medios se transfirió en volumen de 10ml a 2 tubos Falcon.
2. Las muestras tomadas de cada uno de los medios de cultivo se centrifugaron a 12.000 rpm por 5 minutos, y posterior a ello, se retiró todo el sobrenadante para poder secar las algas a una temperatura de 80°C en plato de porcelana.
3. Cuando las algas se secaron, se transfirió en tubos de ensayo 0,5 mg del contenido en polvo y se les adicionó 0,5ml de etanol junto con perlas de vidrio envueltas en papel aluminio las cuales se encargan del rompimiento celular al ser agitadas vigorosamente en vortex durante un tiempo de 3 minutos.
4. A cada tubo se le agregó 3 ml de aceite de soja, se mezcló de manera uniforme todo su contenido y para garantizar la correcta extracción del extracto se repitió el proceso desde el paso anterior 3 veces.
5. Posteriormente los tubos se incubaron en baño serológico a una temperatura de 36°C por un minuto e inmediatamente transcurrido el tiempo los tubos se llevaron a baño frío (0-4°C) por un tiempo de una hora ya que el cambio de temperatura contribuye a la separación de la astaxantina de los demás componentes celulares.
6. El extracto obtenido de todo el proceso se centrifugó suavemente a 4.000 rpm en tiempos de 5 minutos y se recolectó el sobrenadante hasta completar los 10 ml.
7. Finalmente se realizó la medición de absorbancias a 667 nm y 475 nm en espectrofotómetro para poder realizar el cálculo de la concentración

de astaxantina extraída por ensayo y teniendo en cuenta si los medios de cultivo tenían o no tratamiento de sales de acetato de sodio (Xiaohui *et al.*, 2015).

Análisis estadístico

Los dos ensayos se llevaron a cabo por duplicado y los datos recopilados se registraron en hojas de cálculo de Excel y se sometieron a un análisis de varianza ANOVA de un factor para establecer diferencias significativas entre los diferentes medios de cultivo; las diferencias se consideraron significativas a una probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Los resultados se presentaron en tablas y gráficas utilizando Excel 2018; para la realización del análisis estadístico se organizaron los datos de la siguiente manera; siendo, T1= Cultivos en medio BBM sin acetato de sodio, T2= Cultivos en medio BBM con acetato de sodio; T3= Cultivos en medio RM sin acetato de sodio, T4= Cultivos en medio RM con acetato de sodio y si se encontraban diferencias significativas entre las variables analizadas, se aplicó el método de Tukey para crear intervalos de confianza y comparar todas las diferencias entre las medias de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Morfología

La microalga *Haematococcus pluvialis* presenta un ciclo de vida que responde de

manera específica a los estímulos ambientales a los que es sometido, caracterizado por la presencia de tres morfologías distintas: la fase vegetativa, que se presenta en tonalidades verdes y cuenta con flagelos que le permiten la facilidad de desplazarse, esta fase tiene una matriz extracelular gelatinosa que rodea la membrana plasmática y es mucho más lábil, además esta es la fase del ciclo en la que la microalga tiene un crecimiento activo (Alcaraz y Gilabert, 2018). La fase palmella, también es de color verde, pero con una estructura esférica y sin flagelos, perdiendo así la movilidad, lo anterior ocurre cuando las condiciones ambientales no son ideales. Finalmente, la fase aplanospora, se distingue por su coloración roja, su forma esférica y la ausencia de flagelos; siendo esta última la fase de crecimiento más importante debido a la capacidad de la aplanospora para sintetizar y acumular astaxantina (Richmond y Qiang, 2013). Esta última, se caracteriza por tener una pared celular extremadamente resistente que rodea la membrana plasmática formada en su mayor parte por un compuesto semejante a la esporopolenina, esto le permite resistir a condiciones ambientales de estrés significativas. En la figura 1, se presentan los tres tipos de morfología que obtuvo *Haematococcus pluvialis* a lo largo de la investigación vistas bajo microscopía óptica en objetivo 40X.

Figura 1. Imágenes de microscopía de los estadios del ciclo de vida en *Haematococcus pluvialis*.

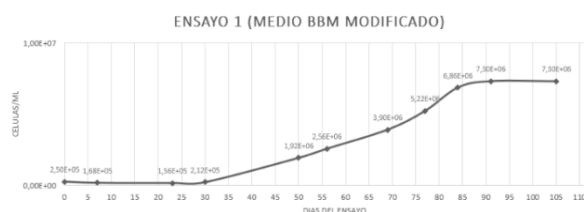


Fuente: Autores

Ensayo 1.

En el primer ensayo realizado en medio de cultivo BBM modificado se registró un recuento inicial de $2,50 \times 10^5$ células/ml y un recuento de $7,30 \times 10^6$ células/ml al finalizar los 105 días de cultivo, tal como se evidencia en la figura 2. Estas cifras sugieren la biomasa producida en *Haematococcus pluvialis* durante el ensayo; la mayoría de estudios se centran en la alta producción celular la cual es posible bajo condiciones favorables de cultivo, pero, así mismo la acumulación de biomasa en las células podría inhibirse cuando existe carencia de nutrientes o contaminación con algún otro tipo de microorganismo (Zhang *et al.*, 2018).

Figura 2. Curva de crecimiento celular en medio de cultivo BBM modificado (menor % nitrógeno)



Fuente: Autores

A partir del día 14 de junio, es decir, a los 22 días de cultivo se suplementaron con acetato de sodio a una concentración de 1,6 g/L cuatro de los diez matraces y el control positivo del ensayo; esto con el fin de establecer una comparación efectiva entre los cultivos tratados y los no tratados a partir del día 23, observando un avance en la producción de astaxantina a lo largo del tiempo, comparando el mismo medio en dos fechas diferentes en donde se evidenció un aumento significativo en la proliferación celular. Para el día 56 del ensayo la producción de astaxantina fue mayor a la de clorofila en todos los medios analizados, ver tablas 5 y 6. Esta producción se dió gracias a los factores de estrés otorgados al medio de cultivo; en los matraces suplementados la producción final de astaxantina fue de 34,01 ug/ml y la producción en los matraces no tratados fue de 27,84 ug/ml, lo cual se debió también al estrés salino inducido durante el ensayo.

Tabla 5. Relación entre las concentraciones de astaxantina y clorofila obtenidas en el primer ensayo sin tratamiento de acetato de sodio (ug/ml)

FECHA	MATRAZ	ABS CLOROFILA	[CLOROFILA]	ABS ASTAXANTINA	[ASTAXANTINA]
15/06/2023	MATRAZ 1 (ST) Día 23	0,188	11,1	0,012	0,94
22/06/2023	MATRAZ 3 (ST) Día 30	0,105	6,27	0,018	1,13
13/07/2023	MATRAZ 5 (ST) Día 50	0,082	4,9	0,114	4,14
19/07/2023	MATRAZ 7 (ST) Día 56	0,055	3,4	0,115	4,17
01/08/2023	MATRAZ 1 (ST) Día 69	0,072	4,4	0,197	6,74
08/08/2023	MATRAZ 3 (ST) Día 77	0,03	1,9	0,206	7,02
15/08/2023	MATRAZ 5 (ST) Día 84	0,02	1,4	0,198	6,77
22/08/2023	MATRAZ 7 (ST) Día 91	0,023	1,5	0,215	7,30

Fuente: Autores

Tabla 6. Relación entre las concentraciones de astaxantina y clorofila obtenidas en el primer ensayo con tratamiento de acetato de sodio

FECHA	MATRAZ	ABS CLOROFILA	[CLOROFILA]	ABS ASTAXANTINA	[ASTAXANTINA]
15/06/2023	MATRAZ 2 (CT) Día 23	0,181	10,7	0,01	0,88
22/06/2023	MATRAZ 4 (CT) Día 30	0,112	6,67	0,081	3,10
13/07/2023	MATRAZ 6 (CT) Día 50	0,099	5,92	0,132	4,70
19/07/2023	MATRAZ 8 (CT) Día 56	0,06	3,66	0,162	5,64
01/08/2023	MATRAZ 2 (CT) Día 69	0,065	3,95	0,211	7,18
08/08/2023	MATRAZ 4 (CT) Día 77	0,045	2,80	0,221	7,49
15/08/2023	MATRAZ 6 (CT) Día 84	0,009	0,72	0,286	9,53
22/08/2023	MATRAZ 8 (CT) Día 91	0,045	2,80	0,295	9,81

Fuente: Autores

La producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* está influenciada por la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo; para lo cual, la mayoría de investigaciones requieren del uso del medio de cultivo BBM. Para este ensayo la deficiencia de nitrógeno aplicado al medio de cultivo fue un factor de estrés significativo y de gran relevancia ya que en la literatura algunos autores describen que altos niveles de nitrógeno en los medios de cultivo conducen a la muerte celular de las algas y consigo la deficiente producción de biomasa lo cual se quiso evitar con la modificación en la preparación del medio (Rey *et al.*, 2019).

La biosíntesis de la astaxantina está relacionada con el cambio morfológico de las células que presenta durante las condiciones de estrés a la que es sometida la microalga *H. pluvialis*; las células vegetativas

experimentan un cambio en su forma, convirtiéndose en células intermedias en fase de enquistamiento y por último células quísticas más conocidas como aplanosporas. Sin embargo, la ruta metabólica comienza con la condensación de dos moléculas de difosfato de geranilgeranilo de 20 carbonos para formar la molécula de fitoeno de 40 carbonos gracias a la enzima fitoeno sintasa (PSY) (Steinbrenner y Linden, 2001). La astaxantina es un tetraterpeno que es sintetizado a partir de unidades de isopreno, por lo tanto, el componente clave de los carotenoides es el pirofosfato de isopentenilo (IPP) que se genera tanto en el citosol como en el cloroplasto de la microalga.

La coloración aparece después de una serie de reacciones de desaturación que alargan la serie conjugada de dobles enlaces carbono-carbono, en donde las enzimas encargadas de esta desaturación son la fitoeno desaturasa (PDS) y caroteno desaturasa (ZDS) aumentando los enlaces dobles de carbono y generando el pigmento característico en los carotenoides (Maquera, 2015).

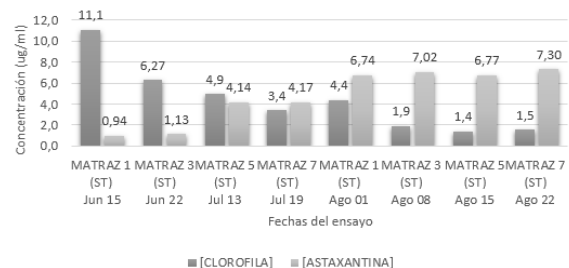
La molécula de ZDS se convertirá en Licopeno y éste será sometido a una ciclación de uno o ambos grupos terminales, catalizada por dos enzimas licopeno ciclasas (LCY-e y LCY-b) (Camacho *et al.*, 2013). A

partir de este proceso, se genera el α -caroteno que corresponde a un precursor de la luteína y β -caroteno que es un precursor de carotenoides como la astaxantina. Finalmente, el β -caroteno es convertido en astaxantina por la adición de grupos carbonilos en la posición 4 y 4', y grupos hidroxilo en la posición 3 y 3', respectivamente, esta última etapa corresponde a la oxigenación, en donde las enzimas β -caroteno cetolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) actúan en el β -caroteno produciendo la astaxantina (Córdoba *et al.*, 2015).

Por otra parte, la salinidad desempeña un papel crucial en el crecimiento de las microalgas; tras la fase exponencial, la aplicación de factores de estrés, como el acetato de sodio y el cloruro de sodio, propicia una mayor producción de astaxantina (Lancheros *et al.*, 2021), en razón de que la salinidad puede influir en la productividad lipídica de las microalgas; estudios han demostrado que la adición de NaCl en combinación con acetato de sodio a concentraciones adecuadas puede aumentar la acumulación de astaxantina mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, las adiciones de NaCl se utilizan con frecuencia para inhibir el crecimiento celular y estimular la síntesis de astaxantina (Hazwani *et al.*, 2021).

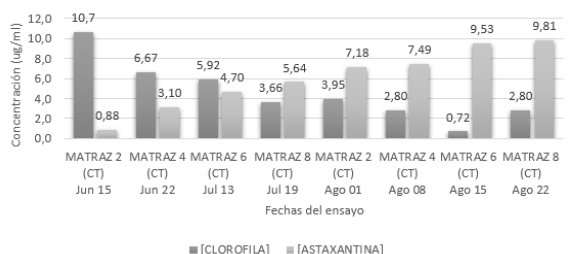
Teniendo en cuenta lo anterior, los resultados del ensayo 1 muestran que el uso de acetato de sodio como único factor de estrés es igualmente eficaz para estimular la producción de astaxantina sin necesidad de combinarlo con otro tipo de sales. Esto sugiere que el acetato de sodio puede ser una opción viable y más sencilla para inducir la acumulación de astaxantina, optimizando el proceso sin comprometer los rendimientos. Adicionalmente, en la figura 3 y 4 se evidencia de manera gráfica el aumento en la producción de astaxantina y la reducción de la concentración de clorofila con el paso de los días a lo largo del ensayo.

Figura 3. Cuantificación de clorofila y astaxantina del ensayo 1 en medio de cultivo BBM sin tratamiento (ug/ml)



Fuente: Autores

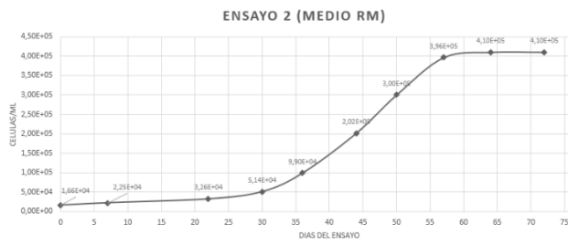
Figura 4. Cuantificación de clorofila y astaxantina del ensayo 1 en medio de cultivo BBM con tratamiento (ug/ml)



Ensayo 2.

En el segundo ensayo realizado en medio cultivo RM se registró un recuento inicial de $1,66 \times 10^4$ células/ml y un recuento de $4,10 \times 10^5$ células/ml al finalizar los 72 días de cultivo, tal como se evidencia en la figura 5.

Figura 5. Curva de crecimiento celular en medio de cultivo RM



Fuente: Autores

A partir del día 10 de octubre, es decir, a los 22 días de cultivo se suplementaron con acetato de sodio a una concentración de 1,6 g/L cuatro de los diez matraces y el control positivo del ensayo; esto con el fin de establecer una comparación efectiva entre los cultivos tratados y los no tratados a partir del día 23 del ensayo, en el cual se evidenció que la producción de astaxantina fue mayor a la de clorofila a partir del día 44 del ensayo, mientras que en fiolas no suplementadas la producción de astaxantina empezó a mostrarse mayor a la de clorofila a partir del día 57 del ensayo, siendo así en los matraces suplementados una producción final de astaxantina de 25,74 ug/ml y la producción en los matraces no tratados de 17,55 ug/ml, ver tabla 7 y 8.

Tabla 7. Relación entre las concentraciones de astaxantina y clorofila obtenidas en el segundo ensayo sin tratamiento de acetato de sodio

FECHA	MATRAZ	ABS CLOROFILA	[CLOROFILA]	ABS ASTAXANTINA	[ASTAXANTINA]
10/10/2023	MATRAZ 1 (ST) Día 22	0,196	11,5	0,009	0,85
18/10/2023	MATRAZ 3 (ST) Día 30	0,193	11,35	0,011	0,91
24/10/2023	MATRAZ 5 (ST) Día 36	0,159	9,4	0,015	1,03
01/11/2023	MATRAZ 7 (ST) Día 44	0,125	7,4	0,097	4,17
07/11/2023	MATRAZ 1 (ST) Día 50	0,096	5,7	0,107	3,92
14/11/2023	MATRAZ 3 (ST) Día 57	0,064	3,9	0,117	4,23
21/11/2023	MATRAZ 5 (ST) Día 64	0,054	3,3	0,126	4,51
29/11/2023	MATRAZ 7 (ST) Día 72	0,054	3,3	0,138	4,89

Tabla 8. Relación entre las concentraciones de astaxantina y clorofila obtenidas en el segundo ensayo con tratamiento de acetato de sodio

FECHA	MATRAZ	ABS CLOROFILA	[CLOROFILA]	ABS ASTAXANTINA	[ASTAXANTINA]
10/10/2023	MATRAZ 2 (CT) Día 22	0,182	10,7	0,01	0,88
18/10/2023	MATRAZ 4 (CT) Día 30	0,177	10,43	0,012	0,94
24/10/2023	MATRAZ 6 (CT) Día 36	0,142	8,40	0,099	3,67
01/11/2023	MATRAZ 8 (CT) Día 44	0,062	3,78	0,195	6,68
07/11/2023	MATRAZ 2 (CT) Día 50	0,056	3,43	0,206	7,02
14/11/2023	MATRAZ 4 (CT) Día 57	0,042	2,62	0,189	6,49
21/11/2023	MATRAZ 6 (CT) Día 64	0,017	1,18	0,158	5,52
29/11/2023	MATRAZ 8 (CT) Día 72	0,012	0,89	0,196	6,71

Fuente: Autores

De manera similar al ensayo anterior, las figuras 6 y 7 muestran gráficamente el incremento en la producción de astaxantina y la disminución en la concentración de clorofila a lo largo del experimento. Este comportamiento fue clave en el proyecto de investigación, ya que ambos ensayos mostraron una clara relación inversamente proporcional entre la clorofila y la astaxantina, lo que sugiere una transición metabólica hacia la síntesis de carotenoides bajo condiciones de estrés.

Figura 6. Cuantificación de clorofila y astaxantina del ensayo 2 en medio de cultivo RM sin tratamiento (ug/ml)

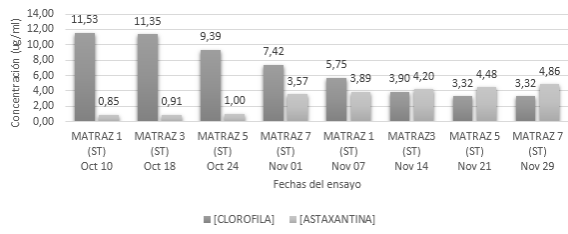
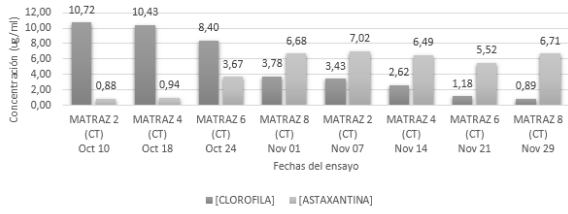


Figura 7. Cuantificación de clorofila y astaxantina del ensayo 2 en medio de cultivo RM con tratamiento (ug/ml)



Fuente: Autores

Luego de realizar el análisis estadístico de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% entre ambos ensayos del estudio, se determinó que la adición de acetato de sodio como factor de estrés adicional no produjo diferencias significativas entre los ensayos (P = 0,17). A pesar de ello si existe una pérdida del 24.32% entre la cantidad de astaxantina producida en el primer ensayo respecto al segundo, calculada mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 1.

$$\text{Porcentaje de perdida} = \left(\frac{\text{Astaxantina BBM} - \text{Astaxantina RM}}{\text{Astaxantina RM}} \right) \times 100$$

Posterior a la extracción con aceite de soja y etanol

La extracción de astaxantina con la metodología de aceite de soja y etanol fue eficiente y se llevó a cabo de manera satisfactoria en los dos ensayos realizados; la cantidad de astaxantina extraída en el primer ensayo fue de 20,89 ug/ml en matraces sin tratamiento y con tratamiento de 22,96 ug/ml; mientras que en el segundo ensayo la extracción de astaxantina en matraces sin tratamiento fue de 13,86 ug/ml y con tratamiento de 20,64 ug/ml. La cantidad de astaxantina extraída no fue la misma producida a lo largo del ensayo, la tabla 9 muestra la diferencia entre ambos procesos y el porcentaje de pérdida posterior a la extracción.

Tabla 9. Concentración de astaxantina producida, extraída y el porcentaje de pérdida posterior a la extracción con aceite de soja y etanol

PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA (ug/ml)			
T1	T2	T3	T4
34,01	27,48	25,74	17,55
PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA POST EXTRACCIÓN (ug/ml)			
22,96	20,89	20,64	13,86
% DE PERDIDA DE ASTAXANTINA POSTERIOR A LA EXTRACCIÓN			
6,45	6,30	6,04	9,14

T1 = Medio BBM sin tratamiento
 T2= Medio BBM con tratamiento
 T3= Medio RM sin tratamiento
 T4= Medio RM con tratamiento

Fuente: Autores

Los resultados del porcentaje de pérdida de astaxantina se justifican en las condiciones del proceso, el seguimiento del protocolo y

se atribuyen en parte al método de extracción empleado; según la literatura, la exposición prolongada a altas temperaturas durante el proceso de extracción contribuye significativamente a la degradación del caroteno, afectando su estabilidad y rendimiento (Velásquez y Salinas, 2022). En el caso del uso de aceites como método de extracción se debe tener en cuenta la influencia del contenido de triglicéridos, ácidos grasos libres, compuestos anfífilos endógenos, glicéridos parciales, fosfolípidos y el grado de refinación del aceite; Li y colaboradores en el año 2019 justifican que entre más contenido de ácidos grasos poliinsaturados existan en el aceite mayor es el rendimiento en la extracción. Para el caso del aceite de soja, este es un tipo de aceite extraído a partir de plantas por lo que contiene alto contenido de ácidos grasos insaturados y es rico en grasas poliinsaturadas como Omega-3, Omega-6 y ácido linoleico (Webster, 2020).

A nivel industrial es importante desarrollar alternativas de extracción funcionales de carotenoides que sean amigables con el medio ambiente y el personal involucrado, como es el caso de los aceites vegetales, los cuales, representan una opción económica, de fácil acceso y bajo costo, lo que los convierte en una alternativa más segura, sostenible y viable. Su uso como disolvente está ganando relevancia en la industria

farmacéutica, cosmética y alimentaria por sus propiedades al ser no volátiles y no irritantes para su aplicación en estas áreas (Velásquez y Salinas, 2022).

Luego de realizar el análisis estadístico de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% entre ambos ensayos, se determinó que la adición de acetato de sodio como factor de estrés adicional produjo diferencias significativas entre los medios de cultivo con y sin tratamiento para la posterior extracción de astaxantina ($P = 0,0000354$). Además, se llevó a cabo una prueba de Tukey para identificar específicamente qué tratamientos presentaron diferencias significativas entre sí, dando como resultado diferencias entre T1-T3, T2-T3 y T3-T4, donde se concluye que el medio BBM modificado demostró ser el más efectivo tanto para la producción como la extracción de astaxantina y la adición del tratamiento de acetato de sodio si es significativo para el proceso al ser encargado de regular la expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* en comparación de los medios de cultivo que no tuvieron tratamiento adicional.

Otro de los factores importantes de estrés además de la adición del acetato de sodio es la intensidad lumínica, la cual provoca daño fotooxidativo y garantiza la fotosíntesis durante el proceso y la supervivencia de la

microalga (Gamboa *et al.*, 2024). Adicionalmente la luz intensa desencadena la síntesis de astaxantina al generar la conversión de pigmentos a energía química en forma de ATP y NADPH a través de una cadena de transporte de electrones fotosintética. Esto está explicado por la capacidad de las algas para almacenar energía química en almidón fijando CO₂ a través del ciclo de Calvin (Hazwani, *et al.*, 2021).

Existen variaciones de estudio con luz blanca, azul y roja durante la fase de crecimiento celular y acumulación de astaxantina, con los que se demostró que el cultivo en biorreactor con luz roja permite aumentar densidad celular, la luz azul induce cambios en la morfología de *Haematococcus pluvialis* y mejora la acumulación de astaxantina en célula (Ávila *et al.*, 2019). Sin embargo, con la realización de los ensayos con luz blanca se concluye que también es útil como factor de estrés productor de astaxantina.

En este proyecto de investigación se observó que el medio BBM modificado fue el más efectivo para producir astaxantina a diferencia del estudio que realizó Niño y colaboradores en el año 2017, en el cual concluyen que el medio de cultivo RM presenta mayores tasas de crecimiento con recuentos celulares de $7,55 \times 10^5$ células/ml,

seguido del medio de cultivo BBM con recuento de $3,88 \times 10^5$ células/ml.

CONCLUSIONES

Al finalizar el trabajo de investigación se concluye que la microalga *Haematococcus pluvialis* es importante para la producción de astaxantina, es un microorganismo que tiene gran capacidad de adaptación al medio y a los factores de estrés a los que es expuesto y por lo tanto es de gran utilidad para las industrias que quieran usar la astaxantina con fines de producción y comercialización.

Se logró una producción eficiente del pigmento en los medios de cultivo BBM y RM, sin embargo, se resalta el medio BBM como el medio de cultivo que aporta mejor las condiciones necesarias para que *Haematococcus pluvialis* crezca, tenga el cambio morfológico característico y produzca astaxantina. Así mismo, se demostró que el uso de acetato de sodio a 1,6 g/L y el uso de luz blanca como factores de estrés en el ensayo son importantes para la eficiente producción del caroteno.

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA 95%) se logró determinar que respecto al crecimiento celular no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados T1, T2, T3 y T4 ($F=1,81$, $P=0,17$), sin embargo el mejor crecimiento se determinó en el tratamiento

2 correspondiente al medio de cultivo BBM con la adición de acetato de sodio al 1,6 g/L obteniendo un valor de $4,73 \times 10^6$ células/ml. Adicionalmente, se logró extraer la astaxantina producida en los medios de cultivos con el método de extracción por disolución en aceite de soja siendo viable a nivel industrial, económico y amigable con el medio ambiente; usar el aceite como solvente sugiere que puede tener aplicación a nivel industrial, alimentario o nutracéutico, y así mismo, al realizar el análisis de la varianza ANOVA 95% se confirma que el medio de cultivo BBM suplementado con acetato de sodio es importante para los procesos de extracción de la astaxantina.

El cultivo a gran escala presenta múltiples retos como lo son la contaminación o los costos que implica su producción a nivel industrial, por tal motivo con este trabajo de investigación se contribuye de forma significativa al desarrollo de protocolos y técnicas de obtención de carotenoides de interés biotecnológico extraído de microalgas de agua dulce como *Haematococcus pluvialis* y junto a ellos la estandarización de técnicas amigables con el medio ambiente como lo es el uso del aceite de soja concluyendo que la extracción de astaxantina con aceites vegetales permiten a futuro la producción del carotenoide a nivel industrial con amplio beneficio para compañías farmacéuticas,

alimentarias y cosméticas que ofrecen productos que contribuyen a la salud de las personas, siendo así este, un proyecto de investigación con proyección social donde se espera que la astaxantina adquiera reconocimiento por sus propiedades benéficas y pueda ser asequible para la persona que la necesite.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcaraz, N., Gilabert J. Caracterización del crecimiento de *Haematococcus pluvialis* con vistas a la producción de inóculos para cultivos en fotobiorreactores para la obtención de astaxantina. (2018). Disponible en: <https://galpemur.es/wp-content/uploads/2019/09/591Informe-Geohabitat-Hematococcus-201812132007.pdf>. Consultado: 06 de junio 2023

Ambati, R., Moi, P., Ravi, S., Aswathanarayana, R. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications: A Review. . *Marine Drugs*. 12(1): 128–152. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917265/#B21-marinedrugs-12-00128>

Aravena, R. Extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* usando CO₂ supercrítico. (2011). Disponible en: <https://repositorio.uc.cl/server/api/core/bitstreams/dd811b3c-6907-422d-9701->

[e81cd1d07864/content](https://doi.org/10.3390/e81cd1d07864/content). Consultado: 12 de diciembre 2023

Ávila, K., Rico, E., Ribery, C. Efecto del estrés producido por la variación del color de luz y la deficiencia de nitrógeno, sobre la expresión de genes y producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. (2019). Disponible en: <https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/3551/EFFECTO%20DEL%20ESTR%20C3%89S%20PRODUCIDO%20POR%20LA%20VARIACI%20C3%93N%20DEL%20COLOR%20DE%20LUZ%20Y%20LA%20DEFICIENCIA%20DE%20NITR%20C3%93GENO.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Consultado: 05 de junio 2023.

Camacho, J., Gonzales, G., Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. *NOVA*. 11 (19).

Córdoba, N., Acero, L., Duque, L., Jimenez, L., Serna, J. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. (2015). *UG ciencia*. (21): 73-82. <https://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/426/729>

Hazwani, S., Fazliani, N., Hafidz, A., Abdul, A., Shen, C., et al. A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of

Natural Astaxanthin. (2021). *Biomolecules*. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/2/25>

Henriques, M., Rocha, J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. (2007). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*: 586-593. www.researchgate.net/profile/Marta-Henriques-3/publication/237752510_Extraction_and_quantification_of_pigments_from_a_marine_microalga_A_simple_and_reproducible_method/links/53d553cb0cf2a7fbb2ea586a/Extraction-and-quantification-of-pigments-from-a-marine-microalga-A-simple-and-reproducible-method.pdf

Gamboa, A., Guerrero, I., Camacho, J. Revisión: efecto del factor estrés, color e intensidad de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*. *Revista Mutis*. 14 (2). <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/revision-efecto-factor-estres-haematococcus-pluvialis/2144>

García, J., Pavía, M., Garcia, T., Chirivella, J., Serrano, A. Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y

caracterización bioquímica. (2017). *Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir*. 9: 115-129. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6041049.pdf>

Gómez, L., Orozco, I., Quiroga, C., Díaz, J., Huérfano, J., Díaz, L., et al. Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae, Volvocales*) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. (2019). *Revista Mutis*. 9 (2): 7–24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>

Lancheros, A., Camacho, J., y Díaz, L. Producción de astaxantina bajo factores de estrés utilizando un biorreactor a escala de laboratorio de 5 L. (2021). *Revista Nova*, 19 (37), 99-119. <https://doi.org/10.22490/24629448.5498>

López, R., Mach, N. Efecto del consumo de astaxantina en la salud. (2012). *Revista Española de Nutrición Comunitaria*. 18 (3): 164-177. www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC%202012-3_art%206.pdf

Molino, A., Mehariya, S., Lovine, A., Larocca, V., Di Sanzo, G., Martino, M., et al. Extracción de astaxantina y luteína de la microalga *Haematococcus pluvialis* en fase roja utilizando tecnología de extracción con

fluidos supercríticos de CO₂ con etanol como co-disolvente. (2018). *Marine Drugs*, 16 (11): 432. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266296/#B50-marinedrugs-16-00432>

Niño, C., Rodríguez, F., Díaz, L., y Lancheros, A. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. (2017). *Revista Nova*, 15 (28): 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

Ramirez, D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. (2013). Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/20559/300061.2013.pdf>.

Rey, F., Wu, H., Huang, L., y Zhang, C. Una nueva estrategia para la hiperproducción de astaxantina a partir de la microalga recién aislada *Haematococcus pluvialis* JNU35. (2019). *Investigación sobre algas*. (39) 101466. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2211926418307768>)

Silva, S., Ferreira, I., Dias, M., Barreiro, M. (2020). Pigmentos derivados de microalgas: una revisión bibliométrica de 10 años y un análisis de las tendencias de la

industria y el mercado. *Molecules* , 25 (15), 3406;

<https://doi.org/10.3390/molecules25153406>

Steinbrenner, J., Linden, H. (2001). Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced Astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. *American Society of plant biologists*. <https://academic.oup.com/plphys/article/125/2/810/6099763>

Turck, D., Castenmiller, J., Henauw, S., Kearney, J., Maciuk, A., Naska, A, et al. (2020). Seguridad de la astaxantina para su uso como nuevo alimento en complementos alimenticios. *EFSA journal*. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2020.5993>

Velasquez, I., Salinas, N. (2022). Uso de aceites comestibles como solventes para la extracción de compuestos bioactivos: Una revisión. *Revista ciencia e ingeniería*. 43(1) No. 1: 41-52. https://www.researchgate.net/publication/356603832_Uso_de_aceites_comestibles_como_solventes_para_la_extraccion_de_compuestos_bioactivos_Una_revision_parte_A_Use_of_edible_oils_as_solvents_for_the_extraction_of_bioactive_compounds_A_review_part_A#fullTextFileContent

Webster, A. Serie de la soya: tercera parte. (2020) *Food insight*. Consultado el 09 de octubre de 2024. Disponible en: <https://spanish.foodinsight.org/dieta-y-salud/serie-de-la-soya-tercera-parte-aceite-de-soya>

Xiaohui, Li; Ning, Z; Donghong, S; Jun, Z. Optimization of the extraction process of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with oil dissolution method. (2015). *Agricultural Biotechnology*. 4(6): 70-72. <https://www.proquest.com/openview/d4f863fd80a68fda20ea1120dcb6ee94/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1596359>

Zhang, W., Zhou, X., Zhang, Y., Cheng, P., Ma, R., et al. Mejora de la acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* mediante la intensidad de la luz acoplada y la privación de nitrógeno en fotobiorreactores de columna. (2018) *J. Microbiol. Biotechnol.* (28) 2019–2028. <https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1807.07008>