



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRODUCCIÓN DE ASTAXANTINA A PARTIR DE LA MICROALGA
HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía
Ing. Roberto Carlos Granda Jaramillo

Autora
Gabriela Patricia Granda Jara

Año
2015

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Roberto Carlos Granda Jaramillo
Ingeniero Agrónomo
171623959-3

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Gabriela Patricia Granda Jara
172087423-7

AGRADECIMIENTOS

A Dios porque sin Él nada de esto habría sido posible.

A mis padres, hermanos y sobrinos por su amor incondicional, paciencia, motivación y apoyo.

Al Ing. Roberto Granda por su amistad y la ayuda brindada en mi trabajo de titulación.

Al Ing. Carlos Valenzuela Presidente Ejecutivo de la empresa EQUABIOTECH CIA. LTDA y a todo el equipo de trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, mis padres,
hermanos y mis sobrinos,
son mi mayor motivación
para ser mejor cada día.

RESUMEN

La microalga *Haematococcus pluvialis* ha sido de mucha importancia en los últimos años en áreas de alimentos, cosmética, agricultura y ambiental, por su gran capacidad de acumular astaxantina. La astaxantina es un carotenoide usado en distintas industrias como la cosmética, alimenticia, farmacéutica. Sin embargo, *Haematococcus pluvialis* pese a sus maravillosas propiedades, presenta crecimiento lento y un alto costo de producción, lo cual de manera directa ha afectado la producción de astaxantina en grandes cantidades.

El objetivo de la presente investigación fue determinar las condiciones óptimas de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* usando de tres medios de cultivo en base a fertilizantes orgánicos y con diferentes intensidades de iluminancia. Los medios de cultivo fueron utilizados en tres concentraciones diferentes (0.10%, 0.25% y 0.50%), el fotoperiodo utilizado fue 12:12 horas, y al alcanzar la fase estacionaria se evaluó la producción de biomasa y el cultivo fue expuesto a 5000 y 8000 lux por 6 días, la medición de astaxantina se realizó por espectrofotometría a 470 nm. El medio de cultivo Nitrofoska al 0.50% fue el que mayor producción de biomasa seca obtuvo con un valor promedio de 0.370 g siendo un 246,5% más efectivo que Fuerza Verde y 60% más que Algaenzim, En relación a la producción del carotenoide se comprobó la dependencia biomasa-concentración astaxantina siendo el medio Nitrofoska 0.50% a 8000 lux el que mayor producción con un valor de 0.237 mg.g⁻¹.

ABSTRACT

The microalgae *Haematococcus pluvialis* has been very important in recent years in the areas of food, cosmetics, agriculture and environmental, for its ability to accumulate astaxanthin. Astaxanthin is a carotenoid used in various industries such as cosmetic, food, pharmaceutical. However, *Haematococcus pluvialis* despite its wonderful properties, presents slow growth and high production costs, which directly affected the production of astaxanthin in large quantities.

The objective of this research was to determine the optimal conditions for astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* using three culture media based on organic and with different intensities of illuminance fertilizers. The culture media were used in three different concentrations (0.10%, 0.25% and 0.50%), photoperiod used was 12:12, and upon reaching stationary phase and biomass production culture was exposed to 5000 was evaluated and 8000 lux for 6 days, the measurement of astaxanthin was performed by spectrophotometer at 470 nm. The culture medium Nitrofoska 0.50% was the highest production of dry biomass obtained with an average value of 0.370 g still a 246.5% more effective than Green Power and 60% more than Algaenzim, in relation to the production of carotenoid biomass-checked astaxanthin concentration dependence means being Nitrofoska 0.50% to 8000 lux which increased production with a value of 0.237 mg.g⁻¹.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	3
1.3. OBJETIVOS.....	4
1.3.1. General.....	4
1.3.2. Específicos.....	4
CAPÍTULO II.....	5
2.1. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. Factores reguladores del crecimiento de las microalgas.....	8
2.1.3. Aplicación Científica y Tecnológica de las microalgas.....	10
2.1.3.1. Biotecnología de las microalgas.....	10
2.2. <i>Haematococcus pluvialis</i>	11
2.2.1. Generalidades.....	11
2.2.2. Descripción de la especie.....	12
2.2.3. Morfología, estructura y fisiología.....	13
2.2.4. Aplicaciones.....	14
2.2.5. Medios de cultivo.....	14
2.3. Astaxantina.....	16
2.3.1. Generalidades.....	16
2.3.2. Mecanismos de acción.....	18
2.3.3. Aplicaciones y beneficios.....	18
2.3.3.1. Función de antioxidante.....	19
2.3.3.2. Terapia antioxidante.....	20
2.3.3.3. Uso de astaxantina para beneficio humano y animal.....	20
CAPÍTULO III.....	22
3.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22

3.1.1. Microalga en estudio	22
3.1.2. Medios y preparación de cultivo	22
3.1.2.1. Medio NITROFOSKA foliar	22
3.1.2.2. Medio ALGAENZIM	23
3.1.2.3. Medio FUERZA VERDE	24
3.1.3. Condiciones y Sistema de Cultivo	26
3.1.4. Tasa de crecimiento	27
3.1.4.1. Peso seco	27
3.1.5. Evaluación de estrés por iluminancia	27
3.1.6. Determinación de Astaxantina	27
3.1.6.1. Método de extracción de astaxantina	27
3.1.6.2. Cuantificación de astaxantina por espectrofotometría ultravioleta visible	28
3.1.7. Análisis Estadístico	28
CAPÍTULO IV	29
4.1. RESULTADOS Y DISCUSIONES	29
4.1.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	29
4.1.1.1. Bioaumentación	29
4.1.1.2. Medición de Turbidez de <i>Haematococcus pluvialis</i>	29
4.1.1.3. Biomasa	37
4.1.1.4. Astaxantina	44
CAPÍTULO V	50
5.1. CONCLUSIONES	50
5.2. RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS	51

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

En la actualidad existe una tendencia mundial en el medio científico y tecnológico de los alimentos para producir nuevos suplementos alimenticios funcionales de origen natural, que generen un valor agregado en los consumidores. Estos metabolitos no solo pueden ser utilizados como antioxidantes naturales, sino también proporcionar nutrientes, proteínas, carbohidratos de tal manera que se favorezca condiciones óptimas para la salud (Martínez, 2010, pp. 61).

Entre los metabolitos de origen natural de mayor interés, se encuentran los carotenoides, que son los responsables del color natural amarillo, rojo y anaranjado, utilizados en la industria cosmética y farmacéutica. Además de su uso extensivo como colorantes, son utilizadas en el enriquecimiento de alimentos debido a su alta actividad pro-vitamínica A, que se traduce en el fortalecimiento del sistema inmunológico y disminución del riesgo de enfermedades degenerativas (Chew y Park, 2004, pp. 257-258).

Algunas de las fuentes naturales de pigmentos carotenoides estudiada en la última década por su diversidad y propiedades terapéuticas son las microalgas, por esta razón se han producido tecnologías potenciales de cultivo extensivo para la extracción de estos metabolitos. (Plaza, *et al.*, 2008, pp. 33). Entre las principales microalgas que se utilizan y cultivan comercialmente tenemos: *Chlorella Byenrinch* y *Aethrospira Stizenberger* que son utilizadas a gran escala en alimentos de origen natural; *Dunaliella salina*, que a su vez es utilizada en la obtención de beta caroteno y *Hematococcus pluvialis* en la obtención de pigmento astaxantina. (Gouveia, *et al.*, 2005, pp. 987-988).

Haematococcus pluvialis, es una microalga de agua dulce, perteneciente a la clase clorofitas, del orden volvocales. Actualmente tiene un gran potencial comercial, debido a que es uno de los mayores productores de astaxantina a nivel mundial. La astaxantina se produce en la microalga como respuesta a condiciones adversas, algunas de estos factores que generan esto son: carencia de alimento, falta de agua, exceso de luz, temperaturas altas o bajas (Wang, *et al.*, 2003, pp. 1116). Siendo este mecanismo de supervivencia el que permite que la microalga se mantenga latente durante más de cuarenta años en condiciones extremas (Aksu y Efren, 2007, pp. 100).

La astaxantina es un carotenoide de color rojo-naranja de alto poder antioxidante, por sus importantes propiedades antioxidantes se prevé que este carotenoide será de uso común para todas las personas en un futuro no muy lejano gracias a la misma. La astaxantina se produce en algas o fitoplancton así como en un número limitado de hongos y bacterias (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 6). Sin embargo, esta microalga no es de fácil cultivo y presenta ciertas dificultades tales como: tasa de crecimiento lento y presenta un complejo ciclo de vida, los cuales no permiten tener cantidades aceptables del pigmento, lo que ha complicado su aplicación y uso como fuente de carotenoides.

Actualmente existen varios estudios para el establecimiento de medios y condiciones de cultivo que generen cantidades considerables, para pensar en la industrialización de sus metabolitos (Cifuentes, *et al.*, 2003, pp. 344). La necesidad de generar grandes cantidades del pigmento, generó la necesidad de usar nuevas herramientas como la micromanipulación de una sola célula en microscopios ópticos, por lo cual en un estudio realizado por Dragos, *et al.*, (2010, pp. 7) se obtuvo 5.7 mg.g^{-1} , generadas en cultivo discontinuo. En otro estudio se pudo revelar que *Haematococcus pluvialis* es más eficiente en la producción de astaxantina que la especie *Phaffia rhodozyma*, con valores de $0,21 \text{ mg.g}^{-1}$ y 0.015 mg.g^{-1} respectivamente. En el Ecuador no se registran datos sobre la producción de astaxantina, ya que actualmente en el país no se han desarrollado investigaciones.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Haematococcus pluvialis posee gran importancia económica y ecológica, gracias a su potencial producción del pigmento secundario astaxantina, el cual posee aplicaciones relevantes en sectores tales como: ornitología, acuicultura e industria farmacéutica, en donde han contribuido a mejorar las condiciones generales de salud en muchos organismos (Ramírez, 2013, pp. 5) Sin embargo y pese a sus importantes aplicaciones se ha visto que el cultivo de esta microalga presenta limitaciones para la obtención de astaxantina por su crecimiento lento y alto costo de producción, lográndose obtener únicamente cantidades mínimas de este pigmento como ya se ha mencionado (Gómez, *et al.*, 2011, pp. 85).

Actualmente, la producción de astaxantina de origen natural no ha sido desarrollada a gran escala en el país, debido principalmente a que los costos de producción de la misma son elevados en relación a la producción sintética y tradicional de la misma. Cabe mencionar que en el Ecuador, el uso de este carotenoide se da únicamente tras la importación del mismo con elevados costos; por otro lado, la utilización de fertilizante orgánico como sustrato para el crecimiento de las microalgas se ha demostrado es un origen de nutrientes económico y de fácil acceso, gracias al cual se puede lograr rendimientos altos en la producción de este carotenoide (Guerin, *et al.*, 2003, pp. 215).

En base a lo antes mencionado el presente trabajo pretende obtener un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*, que utilice como sustrato fertilizante orgánico para generar un sistema de bioproducción del carotenoide eficiente y de bajo costo para nuestro país (Li, *et al.*, 2011, pp. 570) (Gómez, *et al.*, 2011, pp. 84).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

- Producir astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*.

1.3.2. Específicos

- Evaluar el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* en tres concentraciones diferentes de cada medio de cultivo seleccionado.
- Determinar el crecimiento máximo en base a la producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis* en los diferentes medios de cultivo.
- Realizar el estrés por iluminancia a los tres mejores medios de cultivo para la obtención de astaxantina.
- Determinar cuantitativamente el contenido de astaxantina en la biomasa seca de *Haematococcus pluvialis*.
- Seleccionar y determinar el medio de cultivo y la condición de iluminancia óptima para la mayor producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis* para la obtención de astaxantina.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. Generalidades

Las microalgas son organismos unicelulares, que se clasifican como talofitas, es decir son plantas inferiores, que tiene como características una estructura simple, no vascularizada, no posee tallo, raíz ni hojas (Tabla 1). Están presentes en agua dulce principalmente, en medios marinos y en el suelo, se conoce también que se interrelacionan simbióticamente con otros animales, hongos u otras plantas (Martínez, 2010, pp. 32). Generalmente las microalgas son de vida libre, puede ser unicelulares o vivir en colonias (Richmond, 2004, pp. 203). Se ha llegado a establecer 26000 especies de microalgas con sus respectivas diferencias, pudiendo ser eucariotas como procariotas (Stevenson. *et al.*, 1996, pp. 5).

Las microalgas son organismos fotosintéticos detalle indispensable para la generación de biomasa (Martínez, 2010, pp. 8). Son consideradas como la forma más primitiva de las plantas, pero a diferencia de éstas, las microalgas tienen una eficiencia cuatro veces mayor, para transformar la energía luminosa en energía química, porque su estructura unicelular les permite un mejor uso de la luz y absorción de nutrientes. Las microalgas son reconocidas por su importante papel como productores primarios de la cadena trófica y por ser las primeras en formar materia orgánica. Constituyen la base de las cadenas tróficas ya que representa aproximadamente el 70% la biomasa mundial (Albarracín, 2007).

Tabla 1.- Clasificación de los diferentes grupos de microalgas

REINO	DIVISIÓN	CLASE
Prokaryota eubacteria	Cyanophyta	Cyanophyceae
	Prochlorophyta	Prochlorophyceae
Eukaryota	Glauphyta	Glacophyceae
		Bangiophyceae
		Florideophyceae
	Rhodophyta	Crhysophyceae
		Xanthophyceae
	Heterokontophyta	Bacillariophyceae
		Raphidophyceae
		Dyctyochophyceae
		Phaeophyceae
		Haptophyceae
		Cryptophyceae
		Dinophyceae
	Euglenophyceae	
	Haptophyta	Chlorarachniophyceae
		Prasinophyceae
		Crryptophyta
		Chlorophyceae
		Dinophyta
		Ulvophyceae
		Euglenophyta
		Cladophorophyceae
Chlorarachniophyta		
Bryopsidophyceae		
Chlorophyta		
Zygnematophyceae		
Trentepohliophyceae		
Klebsormidiophyceae		
Charophyceae		
Dasycladophyceae		

Tomado de: (Barsanti y Gualtieri, 2006, pp. 20).

En ambientes acuáticos las microalgas son una importante fuente de alimentos para algunas especies de peces, moluscos y de crustáceos. Se debe tener en cuenta que todos los organismos vivos, tanto acuáticos como terrestres

dependen de manera directa e indirecta de las microalgas, ya que mediante el proceso de fotosíntesis realizado para la respiración de las microalgas se genera el oxígeno necesario para la vida (Martínez, 2010, pp. 19). Gracias a la capacidad de estos organismos unicelulares de transformar de compuestos contaminantes para la obtención del CO_2 , se puede generar cultivos de microalgas cerca de lugares que generen contaminación, ocasionar así un impacto positivo para el ambiente (Albarracín, 2007).

Cada especie de microalgas necesita de condiciones óptimas para su cultivo considerando factores como la temperatura, salinidad, luminancia, nutrientes y pH, e incluso los sistemas de cultivo a utilizar. Los parámetros fisicoquímicos son definidos a nivel de laboratorio y permiten diseñar parámetros exactos para cada microalga lo que permite que estas representen una fuente potencial de pigmentos carotenoides (Moreno, 2010, pp. 1).

Se conoce que muchas de las sustancias que producen las microalgas son producidas también por las plantas, pero la producción de las microalgas presentan diversas ventajas tales como:

- El cultivo de microalgas es considerado un eficiente sistema biológico, que permite el aprovechamiento de la energía solar para la obtención de materia orgánica así como el crecimiento rápido de las microalgas a comparación de las plantas, lo que indudablemente facilita un mayor rendimiento éstas.
- Al ser organismos unicelulares se asegura que se obtendrá biomasa con la misma composición bioquímica.
- Gracias a la manipulación de las condiciones ambientales de cultivo, las especies pueden generar grandes concentraciones de bioelementos.
- Las microalgas pueden desarrollarse en condiciones extremas mientras que las plantas no lo pueden hacer.

- Las microalgas pueden completar su ciclo de vida en pocas horas, lo cual permite la selección de cepas y en muchos casos el mejoramiento genético de las especies (Martínez, 2010, pp. 21).

Las microalgas son de gran importancia en estos tiempos por su crecimiento extremadamente rápido que a comparación de las plantas, tiene un tiempo de duplicación de 3.5 horas promedio durante el crecimiento exponencial (Chisti, 2007, pp. 296) y dentro de 8 y 24 horas se puede realizar la cosecha de la biomasa. Por ejemplo, la soja que actualmente es una de las plantas más cultivadas en EEUU para diversos usos, puede ser cosechada de 1 a 2 veces por año. Por otro lado las condiciones climáticas que son muchas veces un problema para cultivo de plantas terrestres, no implica un riesgo para cultivos de microalgas porque se puede realizar los cultivos en sistemas cerrados o en fotobiorreactores (Serrano, 2008). Por esta razón se considera que el rendimiento y productividad de las microalgas es entre 30 y 100 veces superior a un cultivo como el de la soja (Biodisol, 2008).

2.1.2. Factores reguladores del crecimiento de las microalgas

Como se conoce tanto en el ambiente natural como en el de los cultivos, el crecimiento de una microalga es el resultado de una interacción e interrelación de diversos factores: biológicos, físicos y químicos. Los factores físico-químicos pueden afectar de manera importante el crecimiento de las microalgas, por esta razón se realizan estudios sobre la temperatura, luz, disponibilidad de nutrientes y salinidad. Los factores biológicos se relacionan con el metabolismo de las microalgas y la posible influencia que pueden generar a otros microorganismos (Martínez, 2010, pp. 22)

La condición de la luz es un factor que debe ser considerado. El tiempo de exposición, la intensidad y la calidad son aspectos importantes, que determinan la producción de biomasa y el crecimiento de la microalga. Las condiciones luminosas también generan influencia sobre aspectos metabólicos; varias investigaciones determinan que los factores luminosos son de gran importancia

para la cantidad, la calidad, la movilidad de fitoplancton y la morfología de las células. Las condiciones de luz pueden afectar el crecimiento y síntesis de lípidos, carbohidratos, proteínas, etc. Cuando existe una luz muy fuerte se puede generar la fotoinhibición acompañado de otros problemas que limitan el buen desarrollo de las microalgas (Barsanti y Gualtieri, 2006, pp. 245).

La disponibilidad de nutrientes, es importante para un crecimiento óptimo, cada especie de algas tiene requerimientos especiales en cuanto a nutrientes en el medio de cultivo, pero también se verá influenciada por las diversas condiciones ambientales. Las microalgas son organismos que requieren de macronutrientes como carbono (C), siendo el dióxido de carbono la fuente principal y representa el 50% del peso seco (Chisti, 2007, pp. 297); nitrógeno (N), oxígeno (O), hidrógeno (H) y fósforo (P) además de calcio (Ca), magnesio (Mg), azufre (S) y potasio (K). Requieren de micronutrientes como manganeso (Mn), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y cobalto (Co); muchas microalgas requieren en los medios de cultivos de bajas concentraciones de vitaminas (Martínez, 2010, pp. 23).

La turbulencia en el medio es de gran importancia ya que permite la distribución homogénea de las microalgas, ayuda a que haya una buena asimilación de nutrientes y captan de manera adecuada la luz (González, 2000, pp. 31).

Según datos de la FAO (2009) el pH, se mantiene en un rango óptimo y general para las microalgas que varía entre 7 y 9. Si se manejan valores menores podría causar la muerte de las microalgas (Richmond, 2004, pp. 234). En valores mayores al rango óptimo las microalgas no pueden asimilar algunos elementos traza. Si no se maneja un pH adecuado se puede generar efectos tóxicos dentro del medio ocasionando la inhibición del desarrollo en estos organismos (González, 2000, pp. 32).

La salinidad tiene gran influencia en la capacidad de las microalgas para poder obtener los nutrientes necesarios para el crecimiento y para que tenga una

buena productividad. En varias investigaciones se reporta la disminución de las densidades celulares finales cuando se ha aumentado la salinidad en el cultivo (Moreno, 2010, pp. 2). La salinidad controla y regula el crecimiento gracias al proceso de la ósmosis, generando variabilidad entre las microalgas, siendo un arma letal para el cultivo (González, 2000, pp. 29-30). Se debe tener en cuenta que las microalgas tienen necesidades específicas y además de los factores nombrados, hay otros factores que pueden influir como el tamaño de las células, la aireación, entre otros (Moreno, 2010, pp. 1).

2.1.3. Aplicación Científica y Tecnológica de las microalgas

2.1.3.1. Biotecnología de las microalgas

Según la ONU (1992, pp.3) en el Convenio sobre Diversidad Biológica, define a la Biotecnología como “Toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos”. Por esta razón, varias microalgas han sido ampliamente utilizadas porque sus productos son de alto impacto en varias industrias (Chu, 2012, pp. 34). Desde tiempos antiguos las microalgas han desempeñado un papel importante en la alimentación del ser humano (Anaya, 1993, pp. 6); La escasez de alimentos que hubo entre 1935 a 1940 alrededor de todo el mundo, generó la búsqueda de otras fuentes de alimento, siendo las algas gran fuente de proteínas para el ser humano (Albarracín, 2007).

En la actualidad las microalgas son investigadas porque mediante estas se obtienen compuestos de interés que son utilizados en la acuicultura, alimentación tanto humana como animal, industrial, agricultura, tratamiento de aguas residuales, reducción de dióxido de carbono. Las microalgas son efectivas para la generación de ficobiliproteínas y carotenoides, que son el aspecto central para la biotecnología de microalgas. Varias compañías se ven interesadas en conocer la aplicación de los compuestos producidos por las microalgas para generar una producción comercial estable y a largo plazo (Guerrero, *et al.*, 1999, pp. 215).

Con la producción de microalgas se busca la producción de nuevos combustibles, biopolímeros, plaguicidas, ácidos grasos y pigmentos que sean utilizados para la generación de alimentos funcionales. Se conoce que las microalgas tienen como componente esencial a las proteínas: el valor nutricional va a estar dado, por la disponibilidad de aminoácidos que la constituyen. Otro de los componentes son los lípidos: ésteres de glicerol, ácidos grasos y algunos constituyentes que son semejantes a los de los aceites vegetales. Actualmente las microalgas se las puede encontrar en diversas formas tales: tabletas, cápsulas, polvo extractos. También son comercializadas como un alimento natural o suplemento alimenticio. De igual manera se las puede encontrar siendo parte de diversos alimentos consumidos regularmente como las bebidas, bocadillos, o dulces, tanto como colorantes o suplemento nutricional (Martínez, 2010, pp. 24).

2.2. *Haematococcus pluvialis*

2.2.1. Generalidades

Haematococcus pluvialis es una microalga de agua dulce que ha sido aislada de depósitos de aguas, musgos de estanques, cortezas de piedra en Europa, América del Norte y África. Se maneja la teoría de Pringsheim (1966, pp. 2), quien sugiere que *Haematococcus pluvialis* se distribuyó como quistes secos gracias al viento porque de otra manera, jamás podría haber llegado a todos los lugares donde actualmente se encuentran (Martínez, 2010, pp. 24).

Es una especie que se adapta bien a condiciones extremas de luz, temperatura, concentración de sales, que las diferencian de otras especies de microalgas. Es un alga biflagelada, que pierde la movilidad al encontrarse en condiciones desfavorables de crecimiento formando aplanosporas; este cambio en su estructura va acompañado de una acumulación del 3% del peso seco de pigmento (Hagen, *et al.*, 2001, pp. 82).

Haematococcus pluvialis representa una rica fuente natural de astaxantina. Se conoce que la cantidad de astaxantina que produce es muy alta a comparación

de otros microorganismos. En la actualidad se busca el cultivo de la microalga a gran escala, por su uso en diversas áreas acuicultura, ganadería, alimenticia, cosméticos, entre otros. (Martínez, 2010, pp. 32).

2.2.2. Descripción de la especie

Microalga verde unicelular de agua dulce, conocida también como *Haematococcus lacustris* o *Sphaerella lacustris*, pertenece taxonómicamente al *Phylum Chlorophyta* (Tabla 2).

Tabla 2.- Taxonomía de *Haematococcus pluvialis*

PHYLLUM	Chlorophyta
CLASE	Chlorophyceae
ORDEN	Volvocales
FAMILIA	Haematococcacceae
GÉNERO	<i>Haematococcus</i>
ESPECIE	<i>Pluvialis</i>

Tomado de: (Martínez, 2010, pp. 25).

En el *Phylum Chlorophyta* se debe incluir a todas las algas que están rodeadas por dos membranas, tienen pigmentos fotosintéticos *a* y *b* y forman estados flagelados de gametos o esporas. Las algas verdes también conocidas como clorofitas son un grupo muy extenso y que a lo largo del tiempo han ido evolucionando. Frente a otras microalgas poseen características distintivas que las acercan a plantas vasculares:

- Viven suspendidas como organismos unicelulares que viven aisladas o se mantiene en colonias.
- Las células realizan movimientos conocidos como fototácticos, esto se da mediante mucílago o por la presencia de flagelos.
- Los cloroplastos de las microalgas contiene varios pigmentos como la luteína, zeaxantina y xantofilas. A pesar de tener otros pigmentos estos

no son predominantes, por eso se mantiene el color verde de las microalgas.

- Mantienen reservas de polisacáridos, que se encuentran en forma de gránulos, dispersos en el estroma que es la diferencia con otras microalgas donde los gránulos se encuentran libres en el citoplasma.
- La celulosa es el componente principal de la pared celular.
- Hay microalgas terrestres y marinas, pero la gran mayoría son de agua dulce (Martínez, 2010, pp. 26).

2.2.3. Morfología, estructura y fisiología

Las condiciones favorables de un cultivo de *Haematococcus pluvialis* permiten que esta microalga se componga de células vegetativas flageladas que se encuentran acompañadas de células vegetativas en reposo. Las células vegetativas flageladas tienen forma esférica o elipsoidal, poseen dos flagelos que se caracterizan por tener igual longitud y un solo cloroplasto que tiene forma de copa con pirenoides (Martínez, 2010, pp. 26). Según Santos y Mesquita (1984, pp. 215) las células biflageladas en cultivos líquidos poseen una pared delgada. En estas condiciones las células poseen clorofila *a* y *b* y los carotenoides primarios (Harker *et al.*, 1996, pp. 210) tales como, luteína, violaxantina, zeaxantina y neoxantina (Domínguez, 2011, pp. 4).

Este tipo de células flageladas tienen la característica de parar la división celular después de haber realizado este proceso unas 5 veces. Después las zoosporas dejan de dividirse, se produce fusión celular y se replica el ADN. Posteriormente las células adoptan una forma esférica no móvil debido a la pérdida de sus flagelos (Santos y Mesquita, 1984, pp. 221).

Las condiciones ambientales son extremas en *Haematococcus pluvialis*, provoca cambios morfológicos, fisiológicos y modifica también las características del proceso fotosintético. Esto genera la aparición de aplanósporas rojizas de gran tamaño, que le permiten soportar estas condiciones. Durante la transformación de las células al perder sus flagelos y

convertirse en células inmóviles, se forma una vaina trilaminar que lo convierte resistente a la acetólisis y se genera una gruesa pared secundaria, mediante todos estos cambios se dan la producción de carotenoides secundarios tales como: echinenone y cantaxantina pero el más importante en la actualidad conocido como astaxantina (Martínez, 2010, pp. 27).

2.2.4. Aplicaciones

Haematococcus pluvialis es la fuente natural más rica de astaxantina, por esta razón el ser humano ha visto la necesidad de cultivarla a gran escala (Guerin, *et al.*, 2003, pp. 214). El contenido que produce *Haematococcus pluvialis* de astaxantina puede superar el 4% del peso seco, y superior a cualquier otro organismo. El interés que genera este compuesto está basado en la actividad antioxidante diez veces superior a otros compuestos. Por esta razón se la conoce también como la supervitamina E (Martínez, 2010, pp. 32).

Sin embargo, frente a otras microalgas como *Dunaliella* spp y la *Spirulina* spp. *Haematococcus pluvialis* presenta desventajas. No es de fácil cultivo ya que tiene una tasa de crecimiento lento y un complejo ciclo de vida, que no permiten tener cantidades aceptables del pigmento, lo que ha complicado su uso como fuente de carotenoides (Cifuentes, *et al.*, 2003, pp. 343).

2.2.5. Medios de cultivo

En la actualidad las microalgas han sido de gran importancia, generando la búsqueda de medios de cultivo (Band, 1997, pp. 25), que aseguren altas concentraciones celulares e impliquen el menor gasto posible (Gómez, *et al.*, 2011, pp. 84). Medios de cultivos preparados teniendo como base fertilizantes orgánicos no solo supondría beneficios para las concentraciones celulares, sino también para el medio ambiente, por ende un fertilizante orgánico llevará a tener beneficios importantes no solo a nivel de producción, si no la parte ambiental y por ende económico (Ancín, 2011, pp. 32).

Nitrofoska es un fertilizante orgánico que se encarga de estimular el crecimiento de la planta, ya que provee de todos los nutrientes necesarios para que la planta no tenga ningún desequilibrio fisiológico, es un fertilizante fitotorelable que estimula intensamente aun cuando las concentraciones usadas son pequeñas. (BASF, 2015). Nitrofoska se ha utilizado en varias investigaciones relacionadas con microalgas. Según Maldonado (2014, pp. 82) la microlaga *Graesiella emersonii* tuvo un mayor crecimiento con Nitrofoska en relación a otros sustratos amiláceos.

Fuerza Verde es un fertilizante foliar, soluble en agua y es de alta pureza. Una de las características de Fuerza Verde es que puede ser utilizado varias veces por su bajo contenido de cloruro. Este fertilizante ha sido ideal para usarlo en cultivos de arroz, maíz, sorgo, banano, cítricos maracuyá, papa, col, lechuga, rosas, entre otros, lo cual muestra que su uso en diversas variedades de cultivos ha sido exitoso. Fuerza Verde no ha causado efectos toxicológicos en el ser humano, animales y contaminación en el medio ambiente. Una de las ventajas de Fuerza Verde es que su uso puede ser en diferentes estadíos de la planta (Agrosad, 2014).

Algaenzims es considerado un vigorizante de plantas, mejorador de suelo que potencia el crecimiento de cultivos y es totalmente orgánico, encargado de dar energía al crecimiento y desarrollo de la planta, ayuda a obtener mayor cantidad de biomasa y más raíces. Este tipo de fertilizante ayuda a que la planta sea más resistente a plagas y enfermedades (PalauBioquím, 2008). Este tipo de fertilizantes ha sido utilizado en varias investigaciones sobre la eficiencia que tiene en diversos cultivos y también en las mejoras del suelo (Ilyiná, *et al.*, 2014). Este fertilizante es muy especial porque está hecho a base algas marinas lo cual ha hecho que los cultivos de plantas mejoren significativamente y tengan buenos resultados (González, 2013, pp. 7-8) (Dávila, 2004, pp. 40), ya que como un fertilizante normal posee uno o más de los tres nutrientes primarios (FAO, 2002) y posee extractos de algas marinas lo que le da mayor importancia al fertilizante (Santos, 2007), teniendo en cuenta

que las enzimas de las algas marinas refuerzan el sistema inmunológico, alimentario de las plantas (Gómez y Cepeda, 2010, pp. 13).

2.3. Astaxantina

2.3.1. Generalidades

La astaxantina es un caroteno, de la familia de las xantofilas, que presenta en su estructura tres estereoisómeros. Es producida por la microalga verde *Haematococcus pluvialis*. Se conoce que un gramo de biomasa aporta 10 mg de astaxantina pero mayoritariamente de uno de los estereoisómeros 3S, 3'S (López, 2012), lo que permite que la astaxantina se acumule en los glóbulos lipídicos alrededor de toda la célula (Abalde, *et al.*, 2003, pp. 97), en un rango del 3% al 5% del peso seco en una célula seca. Contiene además 36,7 mg/g de trans-astaxantina y de cis-astaxantina 13,5 mg/g, los cuales se encuentran en forma de monoésteres y diésteres (López, 2012).

La astaxantina presenta un color rojizo que se puede encontrar en animales y plantas de todo el mundo, sobre todo en algas, fitoplancton y en menor cantidad en hongos y bacterias. Al ser las algas y el fitoplancton base de la cadena alimenticia, explica la presencia de este caroteno en diversos animales como la trucha, langosta, gambas y el cangrejo pero principalmente en el salmón. Encontramos la presencia de astaxantina en animales como osos y pájaros que consumen animales marinos (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 10).

La astaxantina es conocida como el antioxidante natural más potente de mundo y es por esta razón que este caroteno ha adquirido gran importancia en la actualidad. Es importante recalcar que la astaxantina es comercializada desde los años noventa como antioxidante, pero su potencial se dio a conocer por su uso en gente que sufría de ciertas enfermedades como la artritis, dejando de sentir dolor y dando al cuerpo fuerza y resistencia (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 90).

Todos estos y más descubrimientos llevaron a realizar ensayos en laboratorio lo cual demostró que se puede dar diversas aplicaciones de astaxantina en la nutrición humana (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 11).

Los principales beneficios que se logran gracias a su utilización como antioxidantes son: disminución de la oxidación lipídica, de ADN y proteica y por ende disminución del estrés oxidativo. El estrés oxidativo alto se ha visto asociado con varias enfermedades como las neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer), patologías causadas por la diabetes, enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide y cáncer (Dragos, *et al.*, 2010, pp. 6) (López, 2012).

Las células tienen la capacidad de adaptarse a ciertas condiciones como el estrés oxidativo, pero cuando las condiciones son extremas y agresivas para la célula y se mantienen constantes en el tiempo, la célula presenta desacoplamiento de funciones celulares, lo cual provoca daños irreversibles y muerte celular. Por esta razón se debe evitar los malos hábitos alimenticios y de salud y de consumo de ciertos alimentos que pueden provocar la producción de radicales libres (López, 2012).

Resulta necesario el consumo de frutas y hortalizas que poseen una variedad de antioxidantes que inhiben la formación de radicales libres, estos efectos se deben a un alto contenido de compuestos bioactivos entre ellos y de los más importantes son los fitoquímicos. Existen gran variedad de fitoquímicos entre ellos los carotenoides como por ejemplo la astaxantina que son de gran interés, ya que tiene una gran bioactividad, que ha demostrado en diferentes tipos de cáncer, enfermedades crónicas inflamatorias, síndromes metabólicos, enfermedades cardiovasculares, entre otras (López, 2012).

En la actualidad el interés para la producción y comercialización de astaxantina, ha aumentado y aún más porque consta en la lista de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) que deja claro la aprobación de esta para su uso como ingrediente en suplementos dietéticos (Cysewski y Lorenz, 2004, pp. 283).

2.3.2. Mecanismos de acción

Los antioxidantes son capaces de retardar o prevenir lo que se conoce como oxidación de moléculas es decir pueden retardar o lograr prevenir reacciones químicas de transferencia de electrones, este tipo de reacciones de oxidación son causantes de daño celular ya que se producen radicales libres que comienzan reacciones en cadena, lo que hace el antioxidante es parar estas reacciones, esto lo logra mediante la inhibición de reacciones y al quitar intermediarios de los radicales libres protegiendo a las células de cualquier daño (Martínez, 2010, pp. 9)

2.3.3. Aplicaciones y beneficios

La astaxantina es de gran importancia en la acuicultura, es utilizada como alimento para el salmón cultivado porque contribuye en el color rojizo de su carne (Dore y Cysewski, 2003, pp. 2). La principal aplicación en el sector de acuicultura es en salmón, trucha, peces ornamentales, camarón y la función de la astaxantina en estas especies es la de pigmentación y control en las etapas de crecimiento (Domínguez, *et al.*, 2005, pp. 426). En el sector de la ornitología en gallinas y pollos se ha logrado una mejora en el color de las yemas de los huevos (Inbarr, 1998, pp. 33). En la industria farmacéutica la aplicación se ha dado sobre radicales libres, sobre la salud humana, piel, ADN, retinas y su función se ha centrado como un antioxidante natural y un fotoprotector (Ramírez, 2013, pp. 4).

En un estudio realizado por Li, *et al.*, (2011, pp. 572), se demostró que el costo de producción de astaxantina natural frente a la sintética puede ser mucho menor si se aplican sistemas conocido como fotobiorreactores raceways abiertos, con una elevada velocidad de crecimiento.

Según Lorenz y Cysewski (2000, pp. 162), la astaxantina es comercializada aproximadamente por \$ 2.500.00 el kilogramo con un mercado mundial estimado de \$ 200 millones anuales, se pueden encontrar en el mercado

diversas presentaciones de astaxantina como polvos, biomasa deshidratada o liofilizada, pero también se presenta como extracto de aceite vegetal. La demanda de los consumidores por productos naturales, hacen que los pigmentos sintéticos hayan ido perdiendo su popularidad, por lo cual es una gran oportunidad para que se dé a gran escala la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* (Martínez, 2010, pp. 11).

La astaxantina, puede combatir inflamaciones, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que su acción antioxidante, se relaciona directamente con la acción antiinflamatoria. El modo de acción es mediante la eliminación de mediadores inflamatorios o enzimas cicloxigenasas (López, 2012).

Varios estudios en ratones revelan que la astaxantina ha demostrado un efecto importante y positivo en la fertilidad, en la obesidad, enfermedades de la piel, enfermedades del sistema ocular, neurodegenerativas, hepáticas, en la progresión y desarrollo del cáncer, entre otras. Se han podido desarrollar diversos estudios en humanos donde se administra astaxantina a diversos pacientes, demostrando que el consumo de astaxantina no muestra efectos adversos de ningún tipo, lo cual garantiza su consumo y administración de manera oral (López, 2012).

2.3.3.1. Función de antioxidante

Hay muchos tipos de antioxidantes que se los pueden consumir en nuestra dieta diaria, los alimentos que tiene este tipo de propiedades antioxidantes son las espinacas o las naranjas, pero se debe tener en cuenta su potencial antioxidante es muy bajo, por esta razón que las propiedades antioxidantes de la astaxantina son muy importantes en la actualidad, ya que es el potencial que esta tiene es muy alta. La oxidación y el daño de los radicales libres en nuestro cuerpo se manifiesta tanto interna como externamente. Gracias a la habilidad de eliminación de radicales libres se retrasa el daño celular y se evita el desarrollo de muchas enfermedades (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 14). La capacidad antioxidante de la astaxantina se debe a la estructura que esta

posee ya que se sitúa donde hay más ataque de los radicales libres, logrando inhibir el daño celular (Gajardo, *et al.* 2011, pp. 7)

2.3.3.2. Terapia antioxidante

Muchos de los procesos que realizamos producen pequeñas cantidades de radicales libres, pero nuestro cuerpo humano está en la capacidad de encargarse de ellos sin la necesidad de consumo de antioxidantes. Por otro lado gracias al consumo de diversos alimentos se neutraliza la acción de los radicales libres. Sin embargo, el estilo de vida que se lleva en la actualidad y debido a diversos factores como el estrés; hace que los mecanismos naturales del cuerpo para eliminarlos no sea suficiente dentro del cuerpo. Por esta razón se busca implementar el consumo de la astaxantina, porque de este modo se lograría obtener cantidades suficientes de antioxidantes que contrarresten la producción de radicales libres generando una terapia antioxidante eficaz (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 39).

2.3.3.3. Uso de astaxantina para beneficio humano y animal

La astaxantina ha sido utilizada en diversas enfermedades para comprobar su modo de acción, se debe tener en cuenta que el consumo de este producto natural, no va a generar un cambio de un día para otro, pero lo que si se generará es un cambio a largo plazo, se debe tener en consideración que cada cuerpo es diferente, por ende su forma de asimilación será distinta (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 36).

Se han realizado varios estudios de diversas enfermedades en humanos, desde una inflamación de tendón hasta enfermedades como el cáncer, determinando que hay un gran beneficio asociado al consumo de astaxantina, lo cual incentiva a seguir produciendo este antioxidante para que se lo consuma de manera permanente y se logre prevenir o tratar enfermedades (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 67).

Mediante varios ensayos con animales de laboratorio, se ha logrado comprobar que el consumo de astaxantina estimula el sistema inmunológico y genera beneficios para distintos animales. Se logró comprobar que el uso de astaxantina en gallinas ponedoras favorece el incremento en la producción de huevos incrementa, que la mortalidad de las gallinas disminuya y mejore su estado de salud. A partir de este resultado se hizo prueba en cerdos, vacas y ovejas demostrando que el número de nacimientos sin vida en estos animales se reducía (Capelli y Cysewsky, 2006, pp. 90).

CAPÍTULO III

3.1. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1. Microalga en estudio

Se utilizó la microalga *Haematococcus pluvialis*, aislada y comercializada por la empresa Nutrealgas localizada en Bogotá, Colombia.

La cepa de *Haematococcus pluvialis* se mantuvo en 4 tubos de ensayo con 30mL de medio de cultivo BRISTOL, con fotoperiodo de 12:12 horas, temperatura promedio de 25°C, agitación con burbujeo suave 24/7 y una iluminancia de 4580 lux.

3.1.2. Medios y preparación de cultivo

En la primera etapa se utilizaron 4 tubos de ensayo con 9 mL de medio de cultivo BRISTOL y 1 mL de inóculo, con fotoperiodo de 12:12 a temperatura de 27°C e iluminancia de 4580 lux y mediante motores de pecera con flujo de aireación constante con burbujeo suave que se lo realizaba las 24 horas del día, 7 días a la semana, esto por un tiempo de 30 días.

Luego se procedió a tomar de cada tubo de ensayo 1 ml de medio con inóculo y se procedió a colocar en los nuevos medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la microalga fueron los siguientes:

3.1.2.1. Medio NITROFOSKA foliar

Se procedió a preparar el medio con el fertilizante orgánico complejo NITROFOSKA foliar 10-4-7-0.2 MgO (Maldonado, 2014, pp. 26), a concentraciones de 0.10%, 0.25% y 0.50% cada una con tres repeticiones, se

aforó con agua destilada en erlenmeyers de 1 l. Luego se autoclavó los medios por 30 minutos a 15 PSI a 121°C.

Este medio cuenta con la siguiente composición (Véase tabla 3).

Tabla 3.- Composición en 1 litro de medio de Nitrofoska.

COMPOSICIÓN: 1 Litro de medio		
Nitrógeno	(N)	10.0%
Magnesio	(K ₂ O)	7,0%
Fósforo	(P ₂ O ₅)	4,0%
Manganeso	(MgO)	0.8%
Azufre	(S)	0.2%
Cobre	(Cu)	140ppm
Zinc	(Zn)	25ppm
Boro	(B)	22ppm
Hierro	(Fe)	17ppm
Molibdeno	(Mo)	3ppm

Tomado de: (Maldonado, 2014, pp. 26).

3.1.2.2. Medio ALGAENZIM

Se procedió a preparar los medios con el fertilizante orgánico ALGAENZIM, a concentraciones de 0.10%, 0.25% y 0.50% cada una con sus respectivas repeticiones, se aforó con agua destilada en erlenmeyers de 1 l. Luego se autoclavó los medios por 30 minutos a 15 PSIA.

Este medio cuenta con la siguiente composición (Véase tabla 4)

Tabla 4.- Composición en 1 litro de medio de Algaenzims.

COMPOSICIÓN: 1 Litro de medio		mg/lit (ppm)
Potasio	(K)	14800
Nitrógeno	(N)	14500
Sodio	(Na)	13660
Magnesio	(Mg)	1320
Fósforo	(P)	750
Calcio	(Ca)	620
Zinc	(Zn)	505
Hierro	(Fe)	440
Cobalto	(Co)	275
Cobre	(Cu)	147
Manganeso	(Mn)	72
Silicio	(Si)	4
Molibdeno	(Mo)	<0.1
Bario	(Ba)	<0.1
Estaño	(Sn)	<0.1
Talio	(Tl)	<0.1
Níquel	(Ni)	<0.1
Antimonio	(Sb)	<0.1

Tomado de: (PalauBioquím, 2008).

3.1.2.3. Medio FUERZA VERDE

Se procedió a preparar los medios con fertilizante orgánico FUERZA VERDE, a concentraciones de 0.10%, 0.25% y 0.50% cada una con sus respectivas repeticiones, se aforó con agua destilada en erlenmeyers de 1 l. Luego se autoclavó los medios por 30 minutos a 15 PSIA.

Este medio cuenta con la siguiente composición (Véase tabla 5)

Tabla 5.- Composición en 1 litro de medio de Fuerza Verde.

COMPOSICIÓN: 1 Litro de medio	
Proteínas totales	45,0%
Nitrógeno	19,6%
Potasio	5,5%
Fósforo	5,0%
Materia Orgánica	4,0%
Calcio	345,0ppm
Hierro	200.0ppm
Tiamina B1	1,78ppm
Riboflavina B2	1,50ppm
Ácido orgánico	1,45ppm
Extractos húmicos	1,4ppm
Triptófano	1,30ppm
Aminoácidos totales	1,0%
Ácido indolbutírico	0.90ppm
Ácido fulvico	0.84ppm
Auxinas	0.82ppm
Niacina	0.58ppm
Giberelinas	0.24ppm
Citoxinas	0.00ppm

Tomado de: (Agrosad, 2014).

De esta manera la tabla 6, muestran los parámetros con los cuales se trabajó en la primera fase de estudio (Medios de cultivo x concentraciones)

Tabla 6.- Codificación de medios de cultivo a diferentes concentraciones para el estudio.

CONC	NITROFOSKA			ALGAENZIM			FUERZA VERDE		
0.10%	NFC1	NFC1	NFC1	AEC1	AEC1	AEC1	FVC1	FVC1	FVC1
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.25%	NFC2	NFC2	NFC2	AEC2	AEC2	AEC2	FVC2	FVC2	FVC2
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.50%	NFC3	NFC3	NFC3	AEC3	AEC3	AEC3	FVC3	FVC3	FVC3
	A	B	C	A	B	C	A	B	C

3.1.3. Condiciones y Sistema de Cultivo

Se realizaron 9 medios de cultivos, con 3 repeticiones por cada medio y concentración de fertilizante, en frascos erlenmeyers autoclavables de 500 ml de capacidad con 500 ml de cultivo (Tabla 6). Cada uno de los cultivos estuvo conectado a un sistema de aireación, se diseñó con vidrio fusible de 0.5 mm y 1,2 m unido a manguera de pecera y a su vez conectado a un motor de pecera de dos salidas, que garantizó la aireación constante de los medios de cultivo (Piña, 2008, pp. 88). Otra de las condiciones utilizadas fue la iluminación, proporcionada mediante lámparas de luz blanca fluorescente, que estaban colocadas alrededor de cada uno de los medios, el periodo de luz fue de 12:12 horas (Castañeda, 2007, pp. 36). Los medios fueron monitoreados todos los días.

Se realizó la medición de la turbidez de cada medio por 20 días, repitiendo la medición 3 veces por cada medio, a la misma hora del día, por medio del espectrofotómetro SHIMADZU UV-1201 a 650 nm de absorbancia (Domínguez, 2011, pp. 41). Cada medio fue homogenizado y se procedía a tomar una muestra de 900 μ L de cada medio (Chico, 2010, pp. 35). Se registraron los valores hasta el final de la fase exponencial y se obtuvieron los valores de absorbancia vs. Tiempo y se pudo realizar el gráfico de estos 2 factores. Mediante el software estadístico InfoStat V.2008, se eligieron los medios con mayor crecimiento.

3.1.4. Tasa de crecimiento

3.1.4.1. Peso seco

Se procedió a obtener el peso seco de las muestras en la fase estacionaria de los cultivos para determinar el crecimiento celular. Se utilizó la metodología descrita por Domínguez (2011, pp. 44), se tomarán 5ml de la muestra y se centrifugarán a 3000 rpm durante 5 min en una centrifuga modelo PLC-03 marca GEMMY, al momento que se resuspendió se procedió a lavar con 3ml de agua destilada y se repitió la centrifugación. Este proceso se lo realizó 2 veces más y se filtró mediante membranas de acetato de celulosa 0.45µm de diámetro de poro y se dejó secar durante un tiempo de 24 horas a 60°C, lo que permitió posteriormente llevar a cabo la medición de biomasa seca en una balanza analítica Analytical Balance FA2204C (220 g a 0.0001 g) y los datos obtenidos se registraron y analizaron por medio del software estadístico InfoStat V.2008 (Rosales, *et al.*, 2012, pp. 50).

3.1.5. Evaluación de estrés por iluminancia

Se evaluó el efecto de las iluminancias cuando los medios de cultivo con mayor cantidad de biomasa alcanzaron la fase estacionaria. Para esto se eligió dos iluminancias (Brinda, *et al.*, 2004, pp. 1291): 5000lux (Ramírez, 2013, pp. 26) y 8000lux (Sosa, 2009, pp.12) que fueron determinadas por luxómetro. Los medios estuvieron expuestos a estrés lumínico de manera continua por un tiempo de 144 horas (6 días) (Domínguez, 2011, pp. 48).

3.1.6. Determinación de Astaxantina

3.1.6.1. Método de extracción de astaxantina

Para determinar la cantidad de astaxantina total de *H. pluvialis* se procedió a extraer 10 mg de polvo seco de microalga en un tubo de ensayo con 1 ml de hexano y se lo dejó en reposo por 12 horas, en total oscuridad (Herrera, 2011,

pp. 23). Luego de este tiempo se centrifugó utilizando la centrifuga modelo PLC-03 importada marca GEMMY a 4000 rpm por 2 minutos y se recuperó el sobrenadante. Este procedimiento se lo realizó 6 veces hasta que el polvo de *H. pluvialis* haya perdido la mayor cantidad de color. Se tomaron 2 cm³ del sobrenadante total a los cuales se les efectuó análisis espectrofotométrico para determinar el contenido de astaxantina (Aravena, 2011, pp.13).

3.1.6.2. Cuantificación de astaxantina por espectrofotometría ultravioleta visible

La cantidad total de astaxantina en la muestra expresada como contenido de astaxantina fue medida por espectrofotometría ultravioleta visible (Herrera, 2011, pp. 23) (Goodwin y Srisukh, 1949, pp. 269) en un equipo SHIMADZU UV-1201. Para efectuar la cuantificación, el extracto recuperado en cada uno de los viales fue resuspendido en 5 cm³ de metanol de los cuales se tomó volúmenes de 1µl, se agitó 5 min, se centrifugó 15 min a 3000 rpm y se obtuvo la absorbancia en espectrofotómetro ultravioleta visible a una longitud de onda de 470 nm (Mendes-Pinto *et al.*, 2001, pp. 20) (Rodríguez, 2001, pp. 46). Se cuantificó astaxantina utilizando una curva estándar cuya ecuación fue:

$$y = - 0.0066 + 0.1534 x \quad \text{(Ecuación 1)}$$
$$R^2 = 0.9992$$

Herrera, 2011

3.1.7. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las variables analizadas fueron validados mediante análisis de varianza (ANOVA) y el Test de Duncan (Sahandi, 2011, pp. 527). Se utilizó el software estadístico InfoStat V.2008

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1.1. *Haematococcus pluvialis*

4.1.1.1. Bioaumentación

La muestra de la microalga obtenida de la empresa Nutrealgas localizada en Bogotá, Colombia, fue conservada en 4 tubos de ensayo con medio Bristol a condiciones de fotoperiodo 12:12 horas, temperatura promedio de 25°C, con burbujeo suave e iluminancia de 4580 lux. Una vez observado la aparición de colonias de microalgas se procedió a inocular en medio Nitrofoska, Fuerza Verde y Algaenzims a concentraciones de 0.10%, 0.25% y 0.50 con tres repeticiones cada una.

4.1.1.2. Medición de Turbidez de *Haematococcus pluvialis*

Los valores obtenidos en la Tabla 7 con respecto a la turbidez de *Haematococcus p.*, demostró que Nitrofoska a concentración de 0.10% fue de 1,183 UA, que en relación al medio Fuerza Verde a concentración de 0.50% fue de 0.224 UA, los dos medios se mantuvieron bajo las mismas condiciones de fotoperiodo, iluminancia y aireación. La microalga creció en los tres medios de cultivo de prueba, con composiciones distintas de nitrógeno, fósforo, magnesio, hierro, calcio, zinc, entre otros, macro y micro elementos, determinan el crecimiento de las microalgas (Martínez, 2010, pp. 30). En la Figura 1 se pudo observar que Nitrofoska tuvo una turbidez mayor en sus tres concentraciones en relación a los otros medios de estudio, siendo en todo el tiempo de evaluación predominante.

Tabla 7.- Promedio de turbidez (A) de *Haematococcus* obtenidas en los diferentes medios de cultivo a distintas concentraciones.

ABSORBANCIA A 650nm										
Medio de Cultivo	Fuerza Verde			Nitrofoska			Algaenzim			
Conc. (%)	0.10	0.25	0.50	0.10	0.25	0.50	0.10	0.25	0.50	
DÍAS	1	0.067	0.071	0.094	0.040	0.036	0.041	0.034	0.095	0.065
	2	0.117	0.105	0.151	0.193	0.225	0.144	0.208	0.327	0.271
	3	0.141	0.121	0.173	0.238	0.281	0.207	0.293	0.473	0.359
	4	0.203	0.121	0.153	0.269	0.238	0.224	0.333	0.394	0.364
	5	0.357	0.142	0.162	0.507	0.302	0.330	0.437	0.588	0.462
	6	0.392	0.154	0.159	0.567	0.277	0.316	0.406	0.552	0.451

7	0.442	0.205	0.177	0.731	0.383	0.367	0.478	0.675	0.526
8	0.525	0.275	0.184	1,017	0.502	0.517	0.545	0.712	0.579
9	0.584	0.368	0.192	1,117	0.794	0.706	0.543	0.770	0.631
10	0.662	0.466	0.234	1,417	1,065	0.813	0.630	0.919	0.704
11	0.698	0.484	0.246	1,475	1,294	0.932	0.656	0.974	0.755
12	0.741	0.521	0.305	1,549	1,528	1,112	0.707	1,052	0.849
13	0.818	0.583	0.311	1,716	1,802	1,542	0.777	1,178	0.988
14	0.838	0.580	0.320	1,846	1,853	1,828	0.833	1,258	1,073
15	0.777	0.525	0.297	1,879	1,737	2,026	0.982	1,354	1,115
16	0.864	0.531	0.280	1,948	1,816	2,017	1,074	1,416	1,184

17	0.819	0.411	0.326	1,879	1,690	1,940	1,075	1,353	1,121
18	0.887	0.494	0.259	1,851	1,703	1,925	1,209	1,447	1,208
19	0.798	0.333	0.225	1,736	1,731	1,831	1,275	1,429	1,181
20	0.802	0.349	0.231	1,682	1,696	1,857	1,246	1,437	1,162
PROMEDIO DE ABSORBANCIA	0.577	0.342	0.224	1,183	1,048	1,034	0.687	0.920	0.752

Turbidez de *Haematococcus pluvialis*

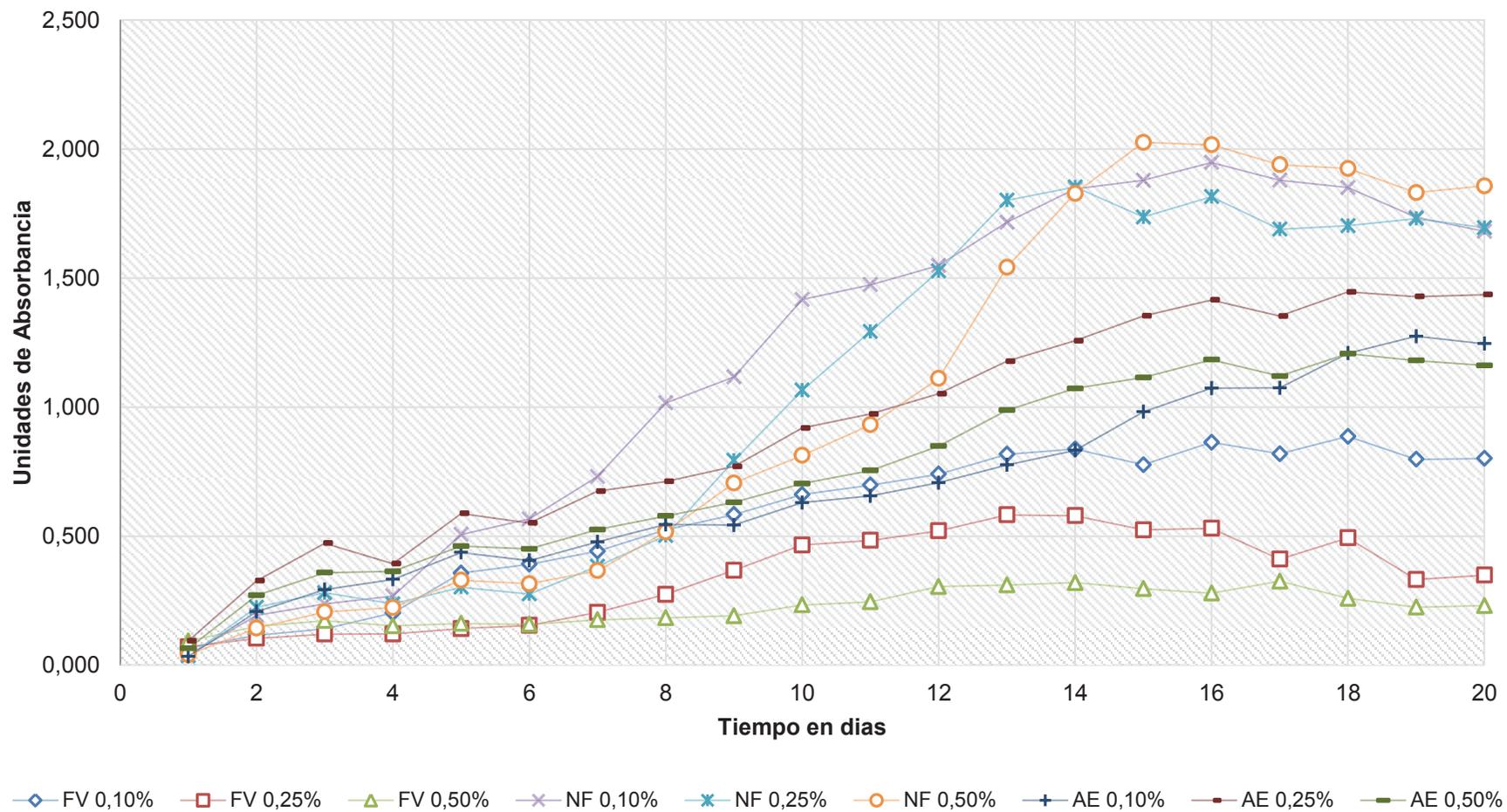


Figura 1. Turbidez promedio de *Haematococcus* cultivado en 3 medios de cultivo y a 3 concentraciones distintas.

Se realizó el análisis de varianza para la turbidez (Tabla 8) de *Haematococcus p.* y se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto medio de cultivo = 0

Ha: efecto medio de cultivo \neq 0

Ho: Efecto concentración = 0

Ha: Efecto concentración \neq 0

Ho: Efecto medio de cultivo x concentración = 0

Ha: Efecto medio de cultivo x concentración \neq 0

Mediante el análisis realizado a la tabla 8 se demostró que las significancias determinadas para el factor concentración, medio de cultivo y la interacción de medio de cultivo x concentración, en relación al nivel de significancia prefijado de 0.05, es menor por tal razón se rechazan las hipótesis nulas de igualdad para los factores. Por lo tanto, uno de los medios en análisis produjo más concentración de turbidez, es decir que *H. pluvialis* creció en mayor cantidad en uno de los medios.

Tabla 8.- Análisis de varianza de 2 factores (concentración y medio de cultivo)

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	156,29	8	19,54	78,07	<0.0001
CONCENTRACIÓN	5,69	2	2,84	11,36	<0.0001
MEDIO	137,23	2	68,61	274,21	<0.0001
MEDIO*CONCENTRACIÓN	13,37	4	3,34	13,36	<0.0001
Error	403,11	1611	0.25		
Total	559,4	1619			

Tomado de (InfoStat V.2008)

Se realizó el Test de Duncan para determinar el medio que obtuvo mayor cantidad de turbidez teniendo en cuenta la concentración en la que se encontraba, y los factores de manera individual y por interacción. En la tabla 9 el Test de Duncan analizó el factor de concentración, teniendo como resultado que la concentración de 0.10% presenta un valor de media de 0.82 que está seguido por la concentración de 0.25% y por esta razón se agruparon dentro del mismo conjunto, y la concentración de 0.50% es baja en relación a las otras dos concentraciones y por esta razón fue agrupado en un nuevo conjunto que es B.

Tabla 9.- Test de Duncan (concentraciones de los medios de cultivos)

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.2502	gl: 1611			
CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.	
0.10%	0.82	540	0.02	A
0.25%	0.77	540	0.02	A
0.50%	0.67	540	0.02	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)

En la tabla 10, el Test de Duncan analizó el factor de medios de cultivo, teniendo como resultado que ningún medio tiene medias semejantes, cada una maneja valores distintos. El medio con la media más alta fue Nitrofoska con 1.09 que y Algaenzims que está en segundo lugar con 0.79, por la diferencia entre estos dos valores y con Fuerza Verde cada uno de los medios fue organizado en un conjunto distinto.

Tabla 10.- Test de Duncan (medios de cultivo)

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.2502	gl: 1611			
MEDIO DE CULTIVO	Medias	N	E.E.	
Nitrofoska	1,09	540	0.02	A
Algaenzim	0.79	540	0.02	B
Fuerza Verde	0.38	540	0.02	C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)

Gracias a la interacción que se presentó en la tabla 11 se observó que el medio con una media alta es Nitrofoska en una concentración de 0.10% que representa un valor de 1.18, por lo cual se agrupó en un solo conjunto y seguido por Nitrofoska de 0.25% y 0.50% que presentan valores cercanos por lo cual se agrupó en un solo conjunto. El medio con una media baja fue Fuerza Verde a 0.50%. Mediante estos valores presentados en el Test de Duncan, se evidenció que el medio con valores pocos significativos fue Fuerza Verde a 0.50%, mientras que el medio con valores de media altos fue Nitrofoska al 0.10% que coincidió con los promedios presentados en la tabla 7.

En relación a lo que se presentó en la figura 1, se evidenció que Nitrofoska a 0.50% tuvo un valor mayor de absorbancia al final del tiempo determinado para el crecimiento, pero el análisis estadístico consideró que Nitrofoska a 0.10% alcanzó la fase exponencial a menor tiempo y mantuvo un crecimiento constante en todo el proceso, por tal razón se puede considerar que Nitrofoska en sus tres concentración es el medio de cultivo que mayor turbidez produjo.

Tabla 11.- Test de Duncan (medios de cultivo x concentraciones).

Test: Duncan Alfa=0.05					
Error: 0.2502		gl: 1611			
CONCEN	MEDIO	Medias	N	E.E.	
0.10%	Nitrofoska	1.18	180	0.04	A
0.25%	Nitrofoska	1.05	180	0.04	B
0.50%	Nitrofoska	1.04	180	0.04	B
0.25%	Algaenzim	0.92	180	0.04	C
0.50%	Algaenzim	0.75	180	0.04	D
0.10%	Algaenzim	0.69	180	0.04	D
0.10%	F. Verde	0.58	180	0.04	E
0.25%	F. Verde	0.34	180	0.04	F
0.50%	F. Verde	0.22	180	0.04	G
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)					

Tomado de (InfoStat V.2008)

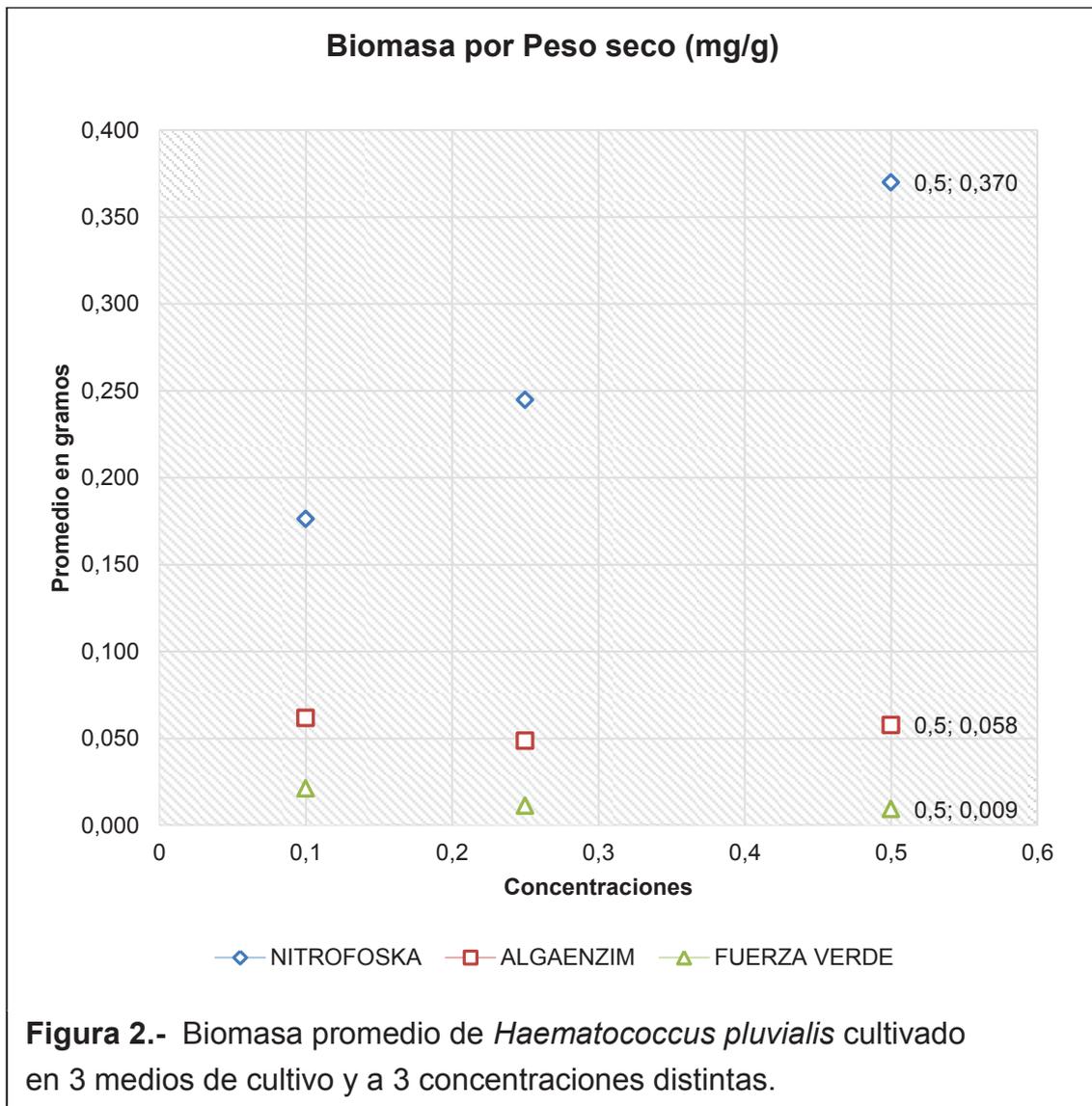
4.1.1.3. Biomasa

Los valores obtenidos con respecto a la biomasa de la microalga *Haematococcus pluvialis* se muestran en la tabla 12, en la cual se observó que el promedio más alto fue de 0.370 g de peso seco en medio Nitrofoska a una concentración de 0.50% y el menor fue de 0.009 en medio Fuerza Verde a una concentración de 0.50%. Richard (2012, pp. 43), planteó y demostró que la agitación constante en los medios de cultivo generó cantidades de biomasa mucho más grandes y que la homogenización de los medios permitió que los nutrientes se dispersen y se asimilen correctamente.

Tabla 12.- Promedio de la Biomasa obtenida en los diferentes medios de cultivo.

BIOMASA POR PESO SECO (mg/g)									
NITROFOSK A	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Peso solo de microalga (g)	0.164 6	0.180 8	0.183 1	0.237 3	0.218 9	0.278 1	0.354 7	0.434 3	0.3 208
Promedio en gramos	0.176			0.245			0.370		
ALGAENZIM	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Peso solo de microalga (g)	0.049 1	0.061 1	0.074 8	0.050 2	0.076 6	0.019 1	0.072 8	0.032 1	0.0 68
Promedio en gramos	0.062			0.049			0.058		
FUERZA VERDE	1A	1B	1C	2A	2B	2C	3A	3B	3C
Peso solo de microalga (g)	0.007 4	0.042 3	0.013 8	0.013 2	0.004 7	0.015 7	0.010 6	0.011 5	0.0 056
Promedio en gramos	0.021			0.011			0.009		

La figura 2 reflejó la biomasa en relación al peso seco de cada una de las muestras, por lo cual se evidenció que Nitrofoska tuvo la mayor cantidad de biomasa en relación al peso seco en sus tres concentraciones que de igual forma superaron los valores obtenidos en Algaenzim y Fuerza Verde, determinando que los valores de estos dos medios son totalmente insignificantes ante la cantidad obtenida de biomasa en Nitrofoska.



Se realizó el análisis de varianza para la turbidez (Tabla 13) de *Haematococcus* y se verificó las siguientes hipótesis:

Ho: efecto medio de cultivo=0

Ha: efecto medio de cultivo \neq 0

Ho: Efecto concentración=0

Ha: Efecto concentración \neq 0

Ho: Efecto medio de cultivo x concentración=0

Ha: Efecto medio de cultivo x concentración \neq 0

Mediante el análisis que se realizó en la tabla 13 se muestra que las significancias determinadas para el factor concentración, factor medio de cultivo y la interacción de 2 factores, en relación al nivel de significancia prefijado de 0.05, es menor que el nivel de significancia por lo que se rechazan las hipótesis nulas para los tres factores. Por lo tanto, uno de los medios en análisis produjo más concentración de biomasa que los demás, es decir que *Haematococcus* creció en mayor cantidad en uno de los tres medios.

Tabla 13.- Análisis de Varianza de 2 factores (concentración y medio de cultivo).

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.38	8	0.05	67.99	<0.0001
MEDIO DE CULTIVO	0.32	2	0.16	230.18	<0.0001
CONCENTRACIÓN	0.02	2	0.01	12.20	0.0004
MEDIO*CONCENTRACIÓN	0.04	4	0.01	14.80	<0.0001
Error	0.01	18	7.0E-04		
Total	0.39	26			

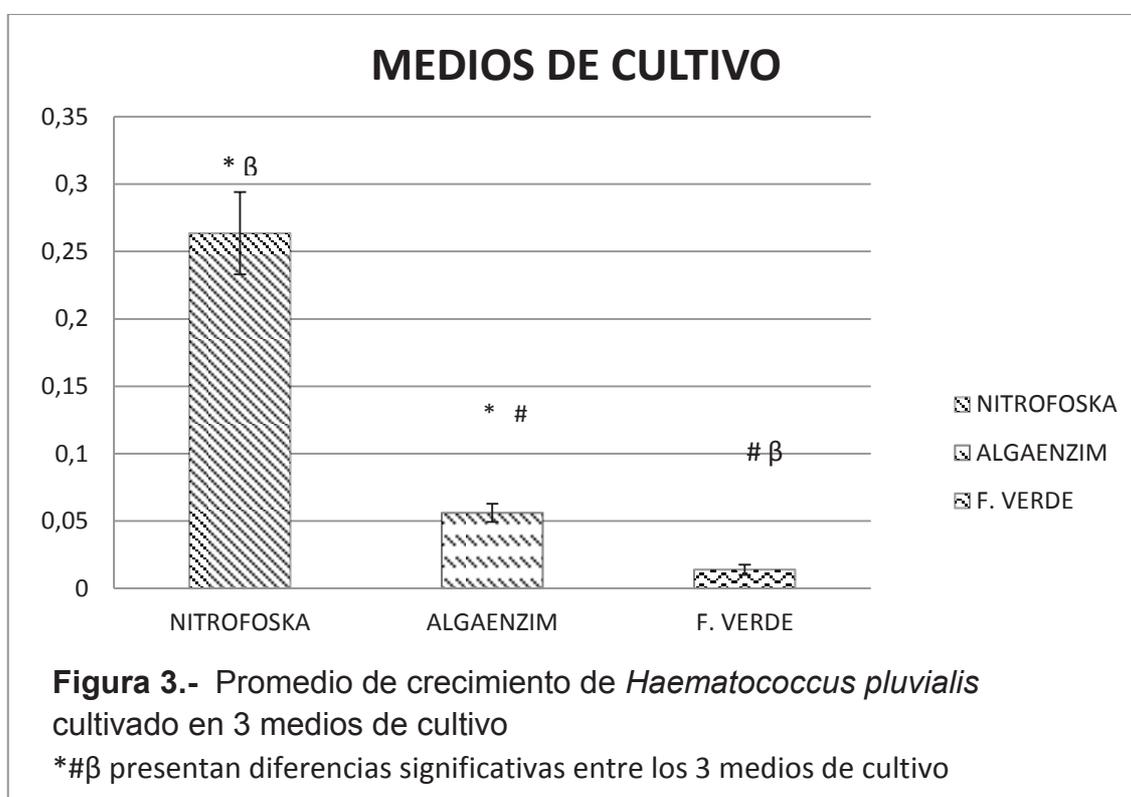
Tomado de (InfoStat V.2008).

Se realizó el Test de Duncan para determinar el medio que obtuvo mayor cantidad de biomasa teniendo en cuenta la concentración en la que se encontraba, y los factores de manera individual y por interacción. En la tabla 14 el Test de Duncan analizó el factor de medio de cultivo, el valor de media de 0.26 que fue el más elevado fue de Nitrofoska, lo cual permitió que Nitrofoska tenga una diferencia muy grande en relación a los dos otros medios y la media de Fuerza Verde obtuvo el valor más bajo de 0.01 y por esta razón se agruparon dentro de distintos grupos. En la figura 3 se evidenció la diferencia significativa entre los 3 medios utilizados, colocando a Nitrofoska como el mejor medio de crecimiento para la microalga.

Tabla 14.- Test de Duncan (medios de cultivo)

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.0007		gl: 18		
MEDIO DE CULTIVO	Medias	N	E.E.	
Nitrofoska	0.26	9	0.01	A
Algaenzim	0.06	9	0.01	B
Fuerza Verde	0.01	9	0.01	C
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)

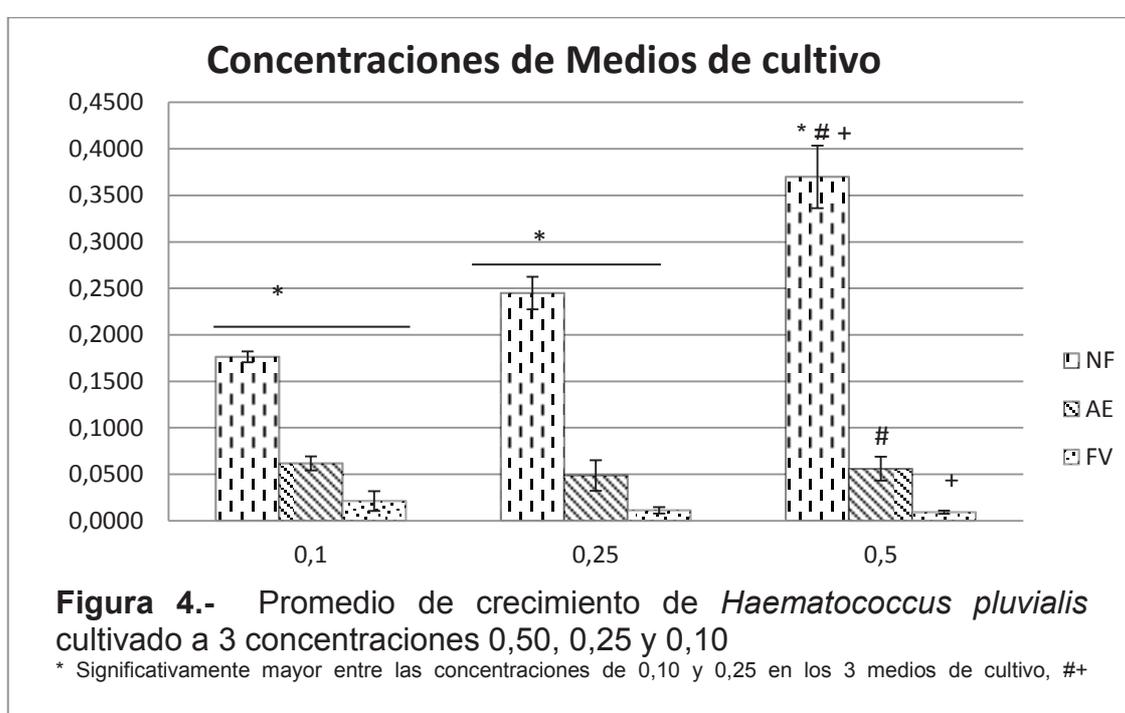


El Test de Duncan determinó la concentración más adecuada para el crecimiento de *Haematococcus*. En la tabla 15 el Test analizó el factor de concentración, teniendo como resultado que la concentración de 0.50% presenta un valor de media de 0.15 mucho más alto que los dos otros fertilizantes (Figura 4), mientras que Algaenzims y Fuerza Verde tuvieron valores similares de 0.10 y 0.09 por lo cual se los agrupo dentro del mismo conjunto.

Tabla 15.- Test de Duncan (concentraciones de los medios de cultivo).

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.0007		gl: 18		
CONCENTRACIÓN	Medias	n	E.E.	
0.50%	0.15	9	0.01	A
0.25%	0.10	9	0.01	B
0.10%	0.09	9	0.01	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)



La tabla 16, presentó una interacción entre el medio de cultivo y la concentración, se encontró que Nitrofoska a 0.50% tuvo una media de 0.37 que le permitió estar en un conjunto fuera de las demás muestras, esto se evidenció en la figura 4, tanto Nitrofoska al 0.25% y 0.10% obtuvieron medios significantes que los colocaron en el segundo y tercer puesto en conjuntos diferentes, y así se determinó que estos dos medios a 0.25% y 0.10% presentan una cantidad de biomasa aceptable (Figura 4). Gracias al Test de Duncan, se evidenció que el medio con valores no significativos fue Fuerza Verde a 0.50% (Figura 4) determinando que la cantidad de biomasa era

demasiado pequeña en relación a la concentración que se estaba usando para su crecimiento, mientras Nitrofoska al 0.10% fue el medio con valores de media altos y mediante esto se determinó que el promedio de biomasa representado en la figura 5 y los datos de la tabla 11 coincidieron con los resultados obtenidos mediante el test de Duncan, es decir que Nitrofoska al 0.5% es el medio que tuvo mayor cantidad de biomasa frente a los otros medios, como se evidenció en la figura 2 donde se evaluó turbidez. En la figura 3 y en la figura 5 también se evidenció que Nitrofoska al 0.5% tiene mayor crecimiento de *Haematococcus* frente al mismo pero con distintas concentraciones 0.10% y 0.25%.

Tabla 16.- Test de Duncan (medios de cultivo x concentraciones).

Test: Duncan Alfa=0.05					
Error: 0.2502		gl: 1611			
Medio de C.	Concentración	Medias	N	E.E.	
Nitrofoska	0.50%	0.37	3	0.02	A
Nitrofoska	0.25%	0.24	3	0.02	B
Nitrofoska	0.10%	0.18	3	0.02	C
Algaenzim	0.10%	0.06	3	0.02	D
Algaenzim	0.50%	0.06	3	0.02	D E
Algaenzim	0.25%	0.05	3	0.02	D E
F. Verde	0.10%	0.02	3	0.02	D E
F. Verde	0.25%	0.01	3	0.02	E
F. Verde	0.50%	0.01	3	0.02	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tomado de (InfoStat V.2008)

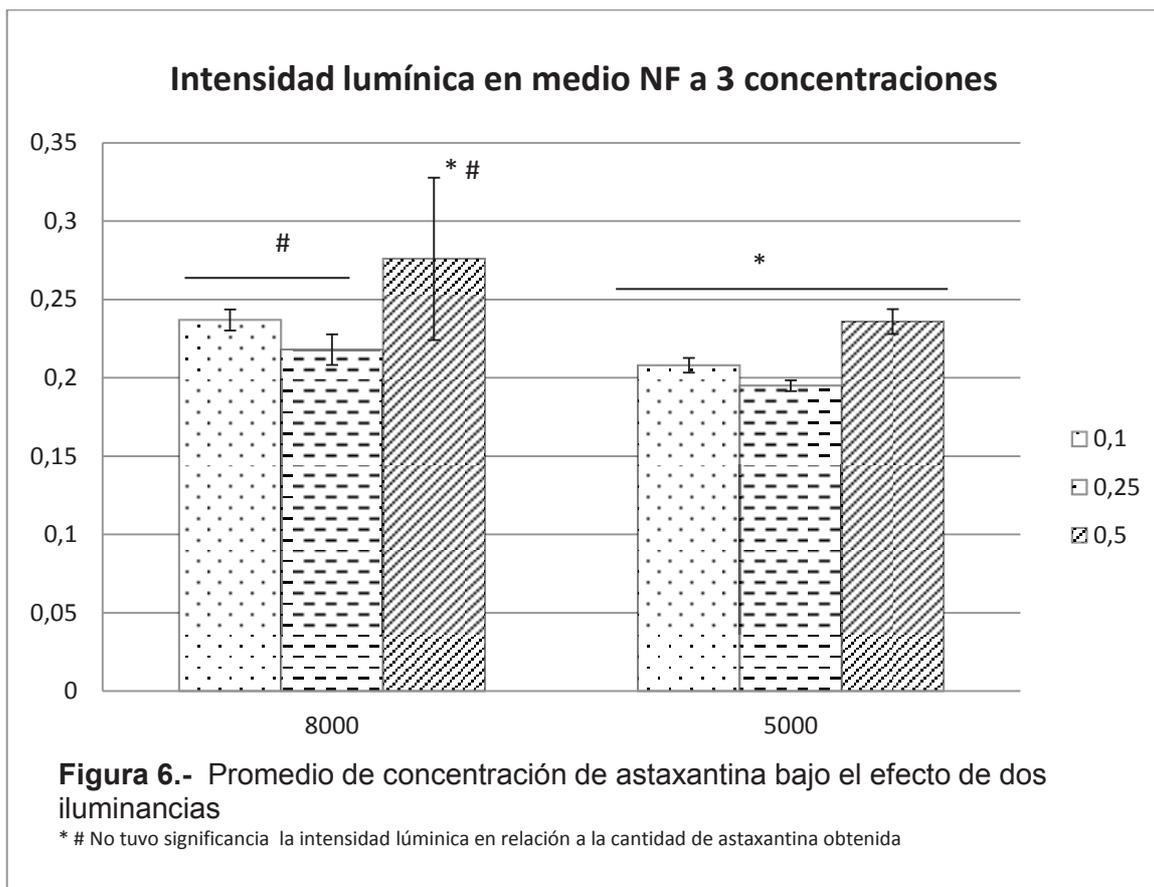
4.1.1.4. Astaxantina

Los valores obtenidos con respecto a la concentración de astaxantina promedio ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) de la microalga *Haematococcus pluvialis* se presentaron en la tabla 17, en la cual se observó que la media más baja 0.195 fue en Nitrofoska de 0.25% con una iluminancia de 5000lux. En la tabla 17, la astaxantina promedio se relacionó con los dos tipos de iluminancia, reconociendo que el valor más alto de astaxantina fue 0.276 generado por el medio Nitrofoska a 0.50% a una iluminancia de 8000 lux. Según Sosa (2009, pp. 18) obtuvo células de *Haematococcus* perfectamente desarrolladas ya que los medios recibieron iluminancia de manera continua con luz roja, que mediante sus pruebas logró afirmar que la luz roja ayudo a la síntesis inicial del pigmento que poco a poco abarcó la célula con color rojo (Bubrick, 1991, pp. 237).

La producción de carotenoides ha demostrado dificultades, porque la tasa de producción es baja y el crecimiento del microorganismo es lento. Por eso se buscó generar estrategias para que la actividad protectora de la microalga no inhiban la producción de carotenoides (Sosa, 2009, pp. 16).

Tabla 17.- Astaxantina promedio obtenidas en medio NF a 3 concentraciones y dos intensidades de iluminancia.

CONCENTRACIÓN DE ASTAXANTINA					
Medios de Cultivo	Intensidad	Repetición	Absorbancia (A)	Concentración Astaxantina (mg.g⁻¹)	Promedio (mg.g⁻¹)
Nitrofoska 0.10 %	8000 lux	1	1,656	0.247	0.237
		2	1,597	0.238	
		3	1,502	0.224	
	5000 lux	1	1,453	0.216	0.208
		2	1,398	0.208	
		3	1,347	0.200	
Nitrofoska 0.25 %	8000 lux	1	1,548	0.231	0.218
		2	1,341	0.199	
		3	1,503	0.224	
	5000 lux	1	1,275	0.189	0.195
		2	1,353	0.201	
		3	1,317	0.195	
Nitrofoska 0.50 %	8000 lux	1	2,515	0.379	0.276
		2	1,459	0.217	
		3	1,550	0.231	
	5000 lux	1	1,619	0.242	0.236
		2	1,483	0.221	
		3	1,650	0.247	



Se realizó el análisis de varianza para la astaxantina (Tabla 18) de *Haematococcus* y se verificó las siguientes hipótesis.

Ho: Efecto concentración = 0

Ha: Efecto concentración \neq 0

Ho: efecto de iluminancia = 0

Ha: efecto de iluminancia \neq 0

Ho: Efecto concentración x de iluminancia = 0

Ha: Efecto concentración x de iluminancia \neq 0

Mediante el análisis de varianza que se realizó en la tabla 18 se muestra que las significancias determinadas para el factor concentración, factor iluminancia y la interacción de los 2 factores, en relación al nivel de significancia prefijado de 0.05, es mayor que el nivel de significancia por lo que se rechazan las

hipótesis alternativas para los 2 factores y su interacción. Por lo tanto, ninguna tuvo una concentración de astaxantina significativa al haber sido sometidos a iluminancia de 5000 lux y 8000 lux por lo cual se descarta que a ese tipo de iluminancia se pudiera haber generado una diferencia significativa (Figura 6). Según Sosa (2009), variables de estrés como la concentración de nutrientes esenciales, siendo deficiente o abundante, ha ocasionado resultados positivos, en la producción de astaxantina, y también sobre el crecimiento de la microalga, generando mayor cantidad de biomasa en el medio.

Existen varios reportes sobre la síntesis de astaxantina y su requerimiento de nitrógeno que ha permitido la acumulación de astaxantina en grandes cantidades, esto se ha logrado provocando una alteración a nivel celular (Boussiba, *et al*, 1991, pp. 1080) (Maillard, *et al* 1993, pp. 95).

Gracias a Ramírez *et al.*, (2001, pp. 259) se encontró que factores como el pH, concentraciones de carbono y la temperatura son relevantes para la producción de diversos carotenoides.

Tabla 18.- Análisis de Varianza de 2 factores (concentración e iluminancia).

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor	
Modelo	0.01	5	2.4E-03	1.65	0.2222	
LUX	4.1E-03	1	4.1E-03	2.79	0.1205	
CONCENTRACIÓN	0.01	2	3.9E-03	2.65	0.1115	
LUX*CONCENTRACIÓN	2.0E-04	2	1.0E-03	0.07	0.9345	
Error	0.02	12	1.5E-03			
Total	0.03	17				

Tomado de (InfoStat V.2008)

Mediante el test de Duncan de la tabla 19 se analizó las medias de las iluminancias, que fueron muy cercanas lo cual generó que se agrupen en un

solo conjunto, entendiendo que al pertenecer al mismo conjunto no se presentan diferencias significativas

Tabla 19.- Test de Duncan (iluminancias).

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.0015	gl: 12			
Lux	Medias	N	E.E.	
8000	0.24	9	0.01	A
5000	0.21	9	0.01	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)

El Test de Duncan determinó que la concentración del medio no es un parámetro relevante en la concentración de astaxantina que se obtuvo. En la tabla 20 se analizó la media de cada concentración y se determinó que no hay una diferencia significativa entre los tres valores por lo cual se agrupan en el mismo conjunto, es decir que las tres concentraciones no influyeron en la concentración de astaxantina.

Tabla 20.- Test de Duncan (concentraciones de los medios de cultivo).

Test: Duncan Alfa=0.05				
Error: 0.0015	gl: 12			
CONCENTRACIÓN	Medias	N	E.E.	
0.50%	0.26	6	0.02	A
0.10%	0.22	6	0.02	A
0.25%	0.21	6	0.02	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)				

Tomado de (InfoStat V.2008)

El test de Duncan en la interacción concentración x iluminancia determinó que la cantidad de astaxantina no es dependiente ni de la concentración que se usó

en los medios de Nitrofoska ni de las dos iluminancias que se usaron (Figura 6), por lo cual todos los datos se agruparon en conjuntos y la media de los datos son muy cercanos ya que varían entre 0.26 de Nitrofoska a 0.50% y 8000 lux y 0.20 de Nitrofoska a 0.25% y 5000 lux (Véase tabla 21). Según Bermúdez (2002, pp. 173), la iluminancia tuvo relación directa con la cantidad de biomasa generada y la capacidad de supervivencia de las células, la iluminancia varió entre 3300 a 60000 lux, porque a valores mayores desde 11000 a 14000 lux, se produjo la inhibición del crecimiento. Existen reportes donde analizaron la variable de estrés que es más eficiente para la producción de astaxantina, determinaron que es la deficiencia de nutrientes (Bermúdez, 2002, pp. 178).

En una investigación realizada, se usó la iluminancia de 8000 lux pero variando la concentración de nutrientes, es decir en uno hay exceso de nutrientes y en otro hay carencia. En la que hubo carencia de nutrientes se obtuvo 5 veces más cantidad de astaxantina en relación al otro ensayo (Ramírez, 2013, pp. 34).

Tabla 21.- Test de Duncan (concentración x iluminancia).

Test: Duncan Alfa=0.05						
Error: 0.0015		gl: 12				
Lux	Concentración	Medias	N	E.E.		
8000	0,50%	0.28	3	0.02	A	
5000	0,50%	0.24	3	0.02	A	B
8000	0,10%	0.24	3	0.02	A	B
8000	0,25%	0.22	3	0.02	A	B
5000	0,10%	0.21	3	0.02	A	B
5000	0,25%	0.20	3	0.02		B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)						

Tomado de (InfoStat V.2008)

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

- El medio Nitrofoska al 0.50% permitió un mayor crecimiento de la microalga y alcanzó la fase estacionaria a los 20 días del cultivo.
- El medio Nitrofoska a una iluminancia de 4580 lux, temperatura ambiente y un fotoperiodo de 12:12 horas es el que mayor cantidad de nutrientes aporta y favorece al crecimiento del microalga.
- Nitrofoska 0.50% produjo la mayor cantidad de microalga con un valor de 0.370 g de biomasa seca, Algaenzim 0.50% con 0.058 g y Fuerza Verde 0.50% con 0.009 g y se concluyó que el medio NF 0.50% es el mayor productor de biomasa.
- La iluminancia de 8000lux es el factor de estrés más adecuado para la producción de astaxantina arrojó una concentración del carotenoide en el medio NF 0.50% de $0.237 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se sugiere el enriquecimiento de los medios de cultivo a base de fertilizantes orgánicos con sales de hierro para incrementar la producción de astaxantina.
- Realizar el estrés de los medios de cultivo a mayores intervalos de iluminancia e incorporar otros tipos de estrés, para mejorar la producción de metabolitos.
- Realizar cultivos a mayor escala usando el medio de cultivo Nitrofoska 0.50% para evaluar su rentabilidad en la producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, controlar mayores parámetros como agitación, inyección de CO₂ al medio y fotoperiodos.
- Se recomienda el continuar investigando el uso de medios de cultivo a base de fertilizantes orgánicos por su bajo costo para la producción de microalgas de interés comercial.

REFERENCIAS

- Abalde, J., Orosa, M., Torres, E y Cid, A. (1999). La microalga *Haematococcus* como fuente de astaxantina., Coruña, España: Universidad de Coruña.
- Agrosad. (s.f.). Fuerza Verde. Recuperado el 2 de Enero del 2015 de <http://www.linkagro.com/component/content/article/426-agrosad-cia-ltda/2020-fuerza-verde>.
- Aksu, Z y Eren, A. T. (2007). Production of carotenoids by isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Ankara, Turquía: Biochemical Engineering Journal.
- Albarracín, I. (2007). XV Simposio Electrónico Internacional. La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad, equidad. Microalgas: Potenciales Productores de Biodiesel.
- Anaya, A. (1993). Evaluaciones de crecimiento de cuatro especies de microalgas en diferentes medios de cultivo alternativos a nivel cepario. Hermosillo, México: Universidad de Sonora.
- Ancín, M. (2011). Evaluación de diferentes tipos de fertilizantes químicos y orgánicos en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Alubia) en el distrito de San Juan de Castrovirreyna-Huancavelica (Perú). Navarra, España: Universidad Pública de Navarra.
- Aravena, R. (2011). Extracción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* usando CO₂ supercrítico. Santiago de Chile, Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Banda, C. (1997). Generación Biotecnológica para la producción de microalgas. Oaxaca, México: Universidad del Mar.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). Algae, Anatomy, Biochemistry and Biotechnology. Boca Raton, Florida: Tylor & Francis Group.
- BASF. (s.f.). Nitrofoska Foliar Líquido 10-4-7. Recuperado el 02 de Enero del 2015 de <http://www.basf.com.ec/negocios/foliar.asp>.
- Bermúdez, J., Lodeiros, C y Morales, E. (2002). Producción de biomasa del microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad

- lumínica y salinidad. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras. 31, 167-185.
- Biodisol. (s.f.). Biocombustible a partir de algas, futuro cercano y prometedor. Recuperado el 19 de Diciembre del 2015 de <http://www.biodisol.com>.
- Boussiba, S. (1991). Astaxanthin Accumulation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Plant Cell Physiol. 32 (7), 1077-1082.
- Brinda, B., Sarada, R., Sandesh, B. y Ravishankar, G. (2004). Accumulation of astaxanthin in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis* – cultural and regulatory aspects. Current Science 87, 1290- 1294.
- Bubrick, P. (1991). Production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Bioresource. Technol, U.S.A. 38: 237-239.
- Capelli, B. y Cysewsky, G. (2006). Astaxantina natural: La reina de los carotenoides. Recuperado el 18 de Noviembre del 2013 de <http://www.bioxantin.cl/temas/Book.pdf>.
- Castañeda, J. (2007). Crecimiento de microalgas y bacterias asociadas a petróleo crudo proveniente de una fosa petrolera del estado Zulia. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia.
- Chew, B. y Park, J. (2004). Carotenoid action on the immune response. Pullman, Washington: Universidad Estatal de Washington.
- Chico, M. (2010). Caracterización a nivel de laboratorio de tres cianobacterias aisladas del área foliar de *Polylepis pauta* del páramo de Papallacta mediante clave microscópica, tiempo de generación y producción de proteína según fuente de nitrógeno, luz y medio de cultivo. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. Palmerston North, Nueva Zelanda: Elsevier.
- Chu, W. (2012). Biotechnological applications of microalgae. International Medical University, Kuala Lumpur, Malasia.
- Cifuentes, A., González, N., y González, M. (2003). Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. Concepción, Chile: Universidad de Concepción.

- Cysewski, G y Lorenz, R. (2004). Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products-Species of High Potential. *Haematococcus*. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. 1, 281 – 288.
- Dávila, J. (2004). Elementos para una agricultura orgánica e Introducción de cultivos alternativos para suelos con problemas de salinidad. Nuevo León, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Domínguez, A. (2011). Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por *Haematococcus pluvialis* y *Phaffia rhodozyma*. México D.F, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Domínguez, A., Ferreira, M., Coutinho, P., Fábregas, J., y Otero, A. (2005). Delivery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* to the aquaculture food chain. *Aquaculture*, 250, 424– 430.
- Dore, J y Cysewski, G. (2003). *Haematococcus* algae meal as a source of natural astaxanthin for aquaculture feeds. Cyanotech Corporation, Hawaii, USA.
- Dragos, N., Bercea, V., Bica, A., Druga, B., Nicoara, A Y Coman, C. (2010). Astaxanthin production from a new strain of *Haematococcus pluvialis* Grown in batch culture. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology* 15(2), 353-361.
- FAO. (s.f.). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis. Recuperado el 30 de Diciembre del 2014 de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>.
- FAO. (s.f.). Los fertilizantes y su uso. Recuperado el 3 de Febrero del 2015 de <http://www.fao.org/3/a-x4781s.pdf>.
- Gajardo, S., Benites, J., López, J., Burgos, N., Caro, C. y Rojas, M. (2011). Astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética. *Biofarbo*, 19(2), 6-12.
- Gao, Z., Meng, C., Gao, H., Li, Y., Zhang, X., Xu, D., Zhou, S., Liu, B., Su, Y., Ye, N. (2013). Carotenoid genes transcriptional regulation for astaxanthin accumulation in fresh water unicelular alga *Haematococcus pluvialis* by gibberellin A3 (GA3). Recuperado el 22 de Diciembre del

2013 de
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/25173/1/IJBB%2050\(6\)%20548-553.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/25173/1/IJBB%2050(6)%20548-553.pdf).

- Gómez, B y Cepeda, M. (2010). Fertilizante foliar de canola de temporal en la Meseta Purhépecha. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Michoacán, México.
- Gómez, O., Rodríguez, R y Subero, S. (2011). Cultivo polialgal (*Chaetoceros gracilis*, *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chuii*) en medios nutritivos no convencionales. Cumaná, Venezuela: Universidad de Oriente.
- González, D. (2013). Efecto de coadyuvantes de la nutrición del tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) establecido en un sistema hidropónico de raíz flotante. Coahuilla, México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- González, M. (2000). Alternativas en el Cultivo de Microalgas. Tesis de Grado. Guayaquil, Ecuador: Universidad Politécnica del Litoral.
- Goodwin, T. y Srisukh, S. (1949). Some observation on astaxanthin distribution in marine crustacean. *Biochemical Journal*, 45(3), 268-270.
- Gouveia, L., Choubert, G., Gomes, E., Pereira, N., Santinha, J y Empis, J. (2002). Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L. 1875), using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. Lisboa, Portugal: Aquaculture Research.
- Guerin, M., Huntley, M. y Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol*, 21(5), 210–6.
- Guerrero, M., Rodríguez, H., Vargas, M., García, M., Campo, J., Moreno, J. y Rivas, J. (1999). Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial. Coruña, España: Universidad de Coruña.
- Hagen, C., Grünewald, K., Xyländer, M., y Rothe, E. (2001). Effect of cultivation parameters on growth and pigment biosynthesis in flagellated cells of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Phycology*, 13(1), 79-87.

- Harker, M. Tsavalos, A. y Young, A. (1996). Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 55, 207-241.
- Herrera, M., Sánchez, D., López, J., Núñez, J. y Moreno, O. (2011). Extracción de la astaxantina y su estabilidad. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 7 (1), 21-27.
- Ilyiná. J., Villarreal S., Rivera, R., Silveyra M., Canales L., Rodríguez, M. (1997). Evaluación del efecto de Algaenzims MR y grupos de microorganismos aislados de éste sobre el crecimiento y vigor de la vid y las propiedades edáficas del suelo. Coahuila, México: Universidad Autónoma de Coahuila.
- Inbarr, J. (1998). *Haematococcus*, the Poultry Pigmentor. *Feed Mix*, 6(2), 31-34.
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., y Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 29(6), 568-574.
- López, J, Sánchez, D, Gutiérrez, M y Vázquez, N. (2006). Quantification of astaxanthin in shrimp waste hydrolysate by HPLC. *Biomed Chromatography*, 20(10), 981-4.
- López, P. (2012). Efecto del consumo de astaxantina en la salud. Barcelona. España: Universidad Abierta de Cataluña.
- Lorenz, R y Cysewsky, G. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.*, 18, 160–167.
- Maillard, P., Thepenier, C. y Gudin, C. (1993). Determination of an ethylene biosynthesis pathway in the unicellular green alga, *Haematococcus pluvialis*. Relationship between growth and ethylene production. *Journal of Applied Phycology*, 5(1), 93-98.
- Maldonado, E. (2014). Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Chlorella EMERSONII* (*Chlorella EMERSONI*) con sustratos amiláceos. Quito, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército.
- Martínez, A. (2010). Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta:

- Volvocales) cultivada en diferentes medios. México DF, México: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología avanzada.
- Mendes-Pinto, M., Raposo, M., Young, A y Morais, R. (2001). Evaluation of different cell disruption processes on encysted cells of *Haematococcus pluvialis*: effects on astaxanthin recovery and implications for bio-availability. *Journal of Phycology* 13; 19.24.
- Moreno, J. (2010). Evaluación del crecimiento y carotenogénesis de cuatro cepas de microalgas marinas bajo condiciones de estrés por iluminación a temperatura y salinidad constantes. Hermosillo, México: Universidad de Sonora.
- ONU. (s.f.). Convenio sobre Diversidad Biológica. Recuperado el 22 de Diciembre del 2014 de <https://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>.
- PalauBioquím. (s.f.). Algaemzims: Potenciador Orgánico. Recuperado el 3 de Febrero del 2015 de <http://hechoenmexicob2b.com/uploadedimages/palau2.pdf>.
- Piña, J. (2008). Producción de la cianobacteria *Nostoc* sp en función de las fuentes nitrogenadas Urea, Amonio y Nitrato en cultivos discontinuos. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia.
- Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 31–39.
- Pringsheim, E. (1966). Nutritional requirements of *Haematococcus pluvialis* and related species. *Journal Phycology*, 2, 1-7.
- Ramírez, D. (2013). Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Ramírez, J., Gutierrez, H. y Gschaedler, A. (2001). Optimization of astaxanthin production by *Phaffia rhodozymba* through factorial design and response surface methodology. *Journal. Biotechnology*, 88, 259-266.
- Richard, J. (2012). *The Science of Algal Fuels: Phycology, Geology, Biophotonics, Genomics and Nanotechnology*. Panacea, USA: Sringer.

- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Primera edición. USA: Blackwell Publishing.
- Rodríguez, D. (2001). A guide to carotenoid analysis in food. Campinas, Brasil: Universidade Estadual de Campinas.
- Rosales, N., Hassanhi, M. y Morales, E. (2012). Actividad Biológica de extractos de dos cepas de la cyanobacteria Nostoc. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia.
- Sahandi, J y Jafaryan, H. (2011). Rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture in batch system with suspension of algae (*Nannochloropsis oculata*) and bakery yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Gonbad, Iran: Universidad Gonbad
- Santos, A. (2007). Evaluación de biofertilizantes foliares en el cultivo de arroz variedad F-50 en la zona de Daule, Provincia del Guayas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Politécnica del Litoral.
- Santos, M y Mesquita, J. (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis., Coimbra, Portugal: Universidad de Coimbra.
- Serrano, M. (2008). Combustibles fabricados a partir de aceite de algas. Recuperado el 23 de Enero del 2015 de <http://www.mkm-pi.com/biotech/50020080856-combustibles-fabricados-a-partir-de-aceite-de-algas/>
- Sosa, A. (2009). Cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*, en lote y fotobiorreactor para la producción de carotenoides. México D.F, México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Stevenson, J., Bothwell, M. y Lowe, R. (1996). Algal Ecology: Fresh Water Benthic Ecosystems. USA: Elsevier.
- Wang, B., Zarka, A., Trebst, A. y Boussiba, S. (2003). Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (chlorophyceae) as an active photoprotective process under high irradiance. Bochum, Alemania: Universidad Ruhr de Bochum.