

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
Campus Omar Dengo
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

Evaluación de la producción de astaxantina en la microalga *Haematococcus pluvialis* con miras al escalamiento en un fotobiorreactor helicoidal

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

Estudiante: Bach. Andreína Leal Sánchez

Tutor: Dr. Luis Roberto Villegas Peñaranda

Asesoras: Dra. Ana Francis Carballo Arce

Lic. Nancy Villalobos Sandí

Heredia, Costa Rica

Mayo, 2023

"Este trabajo de graduación fue_____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial"

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

	<u>NOMBRE</u>	<u>FIRMA</u>
Decana (o)	_____	_____
Director (a) de la Escuela	_____	_____
Tutor	_____	_____
Asesor	_____	_____
Lector	_____	_____
Proponente	_____	_____

RESUMEN

En los últimos años, el interés por la obtención de compuestos bioactivos procedentes de fuentes naturales ha incrementado, debido a los beneficios que estos compuestos químicos ofrecen a la salud humana. Además, de la incidencia que generan en ciertas enfermedades crónicas que están relacionadas directamente con la ingesta de alimentos. La microalga *Haematococcus pluvialis* es considerada una de las principales fuentes biológicas de carotenoides, específicamente de astaxantina. La misma es un carotenoide perteneciente a las xantofilas que presenta una gran actividad antioxidante, dicho compuesto se acumula en el núcleo de las células de la microalga, cuando son expuestas a condiciones de estrés, principalmente a la intensidad lumínica. Esta microalga se caracteriza por poseer un ciclo celular compuesto de dos fases, conocidas como fase verde y fase roja; las cuales hacen referencia a la coloración de sus células según los pigmentos acumulados. Dado a esto, se cultivó *H.pluvialis* bajo condiciones controladas en el laboratorio, haciendo uso de erlenmeyers de 2 L, con un pH inicial de 7,40, a 25 °C, intensidad de luz continua de 70-72 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y suministro de aire las 24 horas. La producción máxima de biomasa obtenida fue de $1,26 \times 10^6 \pm 7,21 \times 10^4$ cel/mL correspondientes al día 9 de iniciado el proceso de cultivo, utilizando el método de conteo celular. Por otro lado, al establecer el periodo de máxima producción celular, los cultivos se sometieron a las condiciones de estrés, es decir, a dos diferentes intensidades lumínicas, específicamente 150 y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, donde posteriormente se determinó el efecto en la generación de biomasa, así como en la producción de astaxantina. Las muestras diarias fueron tratadas para extraer el contenido de astaxantina y se analizaron consecutivamente en HPLC. Se mostró un valor máximo de $1,68 \pm 0,20$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ al día 24, empleando la intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, mientras que al utilizar una intensidad de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ el valor máximo reportado fue $1,69 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 23. Ambas intensidades de luz mostraron una similitud en las concentraciones, sin embargo, el tiempo de espera para lograr la misma concentración, fue menor al utilizar la máxima intensidad lumínica establecida. Finalmente se procedió a determinar la actividad antioxidante del extracto obtenido al aplicar la máxima intensidad lumínica, empleando el método DPPH el cual fue no concluyente y el método ORAC donde se obtuvo rango de $71,9 \pm 0,3$ a $95,8 \pm 1,9$ $\mu\text{mol ET}/\text{g MS}$.

RECONOCIMIENTO

La realización de esta investigación de tesis para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial fue posible, en primer lugar, a la cooperación brindada por mi equipo de trabajo conformado por mi tutor el Dr. Luis Roberto Villegas Peñaranda; quien estuvo a cargo de toda la coordinación del proyecto y a las asesoras, la Dra. Ana Francis Carballo Arce y la Lic. Nancy Villalobos Sandí, a quienes agradezco por su confianza y disposición.

DEDICATORIA

A Dios por dejarme llegar hasta acá y poder concluir con este proyecto de investigación.

A mis padres y hermanos, ya que han sido mi guía y siempre me han apoyado para que yo alcance todos los objetivos que me he propuesto, por estar ahí en los buenos y malos momentos de mi corta vida.

A mis amigos más cercanos, por sus palabras de aliento para que nunca bajara los brazos aun cuando todo se complicaba.

Los amo.

Andreína Leal Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a mi tutor el Dr. Luis Roberto Peñaranda Villegas; por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y ofrecerme su tiempo, paciencia y orientación.

A mis asesoras la Lic. Nancy Villalobos Sandí y la Dra. Ana Francis Carballo Arce por formar parte de mi equipo de trabajo y ofrecerme valiosos consejos en la redacción de esta tesis.

Agradezco enormemente a los señores MSc. José Pablo Sibaja Brenes y MSc. Víctor Álvarez Valverde por apoyarme y facilitarme recursos útiles que me permitieron finalizar con este trabajo de investigación.

Al MSc. Rodrigo Muñoz Arrieta, encargado del área de Bioprospección del Centro de Innovaciones Biotecnológicas, CENIBiot; quien colaboró con este proyecto y fue parte fundamental para la conclusión de los análisis.

A mis colegas Lic. Yaclyn Lucía Salazar Chacón y Bach. María José Villalobos Vega por la ayuda y apoyo que siempre me han dado.

Finalmente, y sin menor importancia, agradezco a mi familia por su amor y aliento.

ÍNDICE DE CONTENIDO GENERAL

	Página
RESUMEN	ii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS	xiii
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Antecedentes y Justificación	1
2. Marco Teórico	4
2.1. Algas: descripción general.....	4
2.2. Microalgas y sus características	6
2.2.1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	6
2.3. Cuantificación del crecimiento en microalgas.....	9
2.3.1. Monitorización del crecimiento celular	10
2.4. Biomasa microalgal	11
2.4.1. Carotenoides	12
2.4.1. Astaxantina	14
2.5. Radicales libres, antioxidantes y actividad antioxidante	17
2.5.1. Métodos para determinación de actividad antioxidante	19
2.5.1.1. Método DPPH: 2,2-difenil-picril-hidracina.....	19
2.5.1.2. Método ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno	20
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	23
3.1. Obtención de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	23
3.2. Curvas de crecimiento de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	23
3.2.1. Preparación del inóculo	23
3.2.2. Curva de crecimiento bajo condiciones iniciales	23
3.2.2.1 Curva de crecimiento basada en peso seco.....	24
3.2.2.2 Curva de crecimiento basada en conteo celular.....	24
3.2.3. Curvas de crecimiento con respecto de las variaciones de intensidad de luz.....	26

3.2.3.1 Curva de crecimiento usando 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	26
3.2.3.2 Curva de crecimiento usando 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	26
3.3. Extracción de astaxantina usando un disruptor celular mecánico	27
3.3.1. Tratamiento de las muestras	27
3.3.1. Procedimiento de extracción	27
3.5. Cuantificación de astaxantina obtenida a partir de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	28
3.6. Evaluación de la actividad antioxidante	29
3.6.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.....	29
3.6.1.1. Preparación de estándares y curva de calibración	30
3.6.1.2. Procedimiento para la determinación de actividad antioxidante	30
3.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante por el método ORAC.....	31
3.6.2.1. Preparación de estándares y curva de calibración	31
3.6.2.2. Procedimiento para la determinación de actividad antioxidante	32
3.7. Análisis estadístico	33
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Curvas de crecimiento de la microalga <i>H. pluvialis</i> bajo condiciones iniciales en el laboratorio.....	34
4.2. Curva de crecimiento de la microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> utilizando variaciones de la intensidad de luz.	41
4.3. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la microalga <i>H.pluvialis</i>	51
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS	59
ANEXOS	65
Anexo 1. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la microalga <i>H.pluvialis</i>	65
Anexo 2. Condiciones de intensidad de luz utilizadas en la elaboración de las curvas de crecimiento de la microalga <i>H.pluvialis</i>	66
Anexo 3. Resultados obtenidos para la generación de las curvas bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.	67
Anexo 4. Resultados obtenidos para la generación de las curvas de crecimiento celular utilizando diferentes intensidades de luz como factor de estrés, en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.....	77
Anexo 5. Resultados obtenidos para la determinación de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de la fase exponencial de la microalga <i>H.pluvialis</i>	92

Anexo 6. ANOVA de un solo factor para la determinación de las diferencias significativas entre las fases exponenciales de las curvas manteniendo condiciones iniciales similares.	93
Anexo 7. Resultados obtenidos de la curva de calibración para determinar el contenido de astaxantina en las muestras analizadas en el HPLC.	95
Anexo 8. Resultados obtenidos de las muestras diarias para determinar el contenido de astaxantina analizadas en el HPLC.....	97
Anexo 9. Datos necesarios para la obtención de la actividad antioxidante mediante el método DPPH y ORAC.....	113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de las algas y sus principales características	5
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la microalga <i>H.pluvialis</i>	7
Cuadro 3. Preparación de los patrones de astaxantina para la curva de calibración	28
Cuadro 4. Gradiente de elución del método de HPLC utilizado	29
Cuadro 5. Preparación de los patrones para la curva de calibración del método DPPH.....	30
Cuadro 6. Preparación de los patrones para la curva de calibración del método ORAC....	32
Cuadro 7. Tasa de crecimiento y tiempo de generación correspondiente a la fase exponencial de la <i>H.pluvialis</i> en condiciones iniciales controladas en el laboratorio, a 150 y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	41
Cuadro 8. Resultados de la actividad antioxidante empleando los métodos DPPH y ORAC.	51
Cuadro 9. Formulación del medio de cultivo BG-11 empleado para la generación de las curvas de crecimiento	65
Cuadro 10. Formulación de la disolución de metales trazas	65
Cuadro 11. Mediciones de las intensidades de luz empleadas en los experimentos para la obtención de las curvas de crecimiento.	66
Cuadro 12. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en peso seco.....	67
Cuadro 13. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga <i>H.pluvialis</i> basada en peso seco.	71
Cuadro 14. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en conteo celular.....	72
Cuadro 15. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular.	76
Cuadro 16. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en el conteo celular empleando una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	77
Cuadro 17. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular, empleando una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	83
Cuadro 18. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en el conteo celular empleando una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	84
Cuadro 19. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular, empleando una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	91
Cuadro 20. Datos utilizados para la determinación de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de la microalga <i>H.pluvialis</i> , comparando las tres curvas de crecimiento.	92
Cuadro 21. Relación de la concentración de los patrones de la curva de calibración de astaxantina con el área obtenida, empleando el método HPLC.	96
Cuadro 22. Datos utilizados para la determinación de la concentración de astaxantina expresada como $\mu\text{g}/\text{mL}$ obtenidos durante el muestreo diario utilizando las dos intensidades lumínicas como factor de estrés.	110
Cuadro 23. Relación de la concentración de los patrones de Trolox de la curva de calibración con el % de inhibición, empleando el método DPPH.....	113

Cuadro 24. Resultados obtenidos para determinar la actividad antioxidante empleando el método DPPH.....	114
Cuadro 25. Relación de la concentración de los patrones de Trolox de la curva de calibración con el área bajo la curva, empleando el método ORAC.....	115
Cuadro 26. Resultados obtenidos para determinar la actividad antioxidante empleando el método ORAC.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la astaxantina.....	2
Figura 2. Fases o estados de crecimiento de la <i>H.pluvialis</i> , a) fase verde y b) fase roja, observada al microscopio a 40X.....	7
Figura 3. Esquema representativo de la morfología de <i>H. pluvialis</i> durante la exposición a condiciones de estrés: (a) etapa vegetativa, (b) fase palmelar, (b2) flagelados acumuladores de astaxantina, (c) transición a la forma de aplanospora y (d) aplanosporas ricas en astaxantina	8
Figura 4. Etapas o fases de las curvas de crecimiento de las microalgas	9
Figura 5. Posibilidades de aprovechamiento de un cultivo de microalgas.....	12
Figura 6. Estructura química del isopreno.....	13
Figura 7. Estructura química básica de un carotenoide.....	13
Figura 8. Propiedades atribuidas a la astaxantina.....	14
Figura 9. Estereoisómeros de astaxantina	15
Figura 10. Producción de astaxantina y sus ésteres según cada especie	16
Figura 11. Fuentes y patologías asociadas a la generación de radicales libres.	18
Figura 12. Reacción del radical DPPH para la determinación de la capacidad antioxidante	19
Figura 13. Reacción del radical AAPH mediante el método de ORAC.....	21
Figura 14. Representación de las reglillas de la cámara de Neubauer	25
Figura 15. Representación del llenado de la placa de 96 pozos para determinar la actividad antioxidante por el método ORAC	33
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>H.pluvialis</i> basada en peso seco expresada en g/L en función del tiempo (días) a una intensidad lumínica de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.....	35
Figura 17. Curva de crecimiento de <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (días) a una intensidad lumínica de 70 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.	35
Figura 18. Cambios morfológicos de la microalga <i>H.pluvialis</i> a) día 0 de iniciado el proceso de cultivo y b) correspondiente al día final (día 13); bajo condiciones iniciales en el laboratorio, observado en el microscopio a 40X	40
Figura 19. Curva de crecimiento <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (horas) a una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.	43
Figura 20. Curva de crecimiento <i>H.pluvialis</i> basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (horas) a una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.	44
Figura 21. Cambios morfológicos de los muestreos diarios durante la exposición de luz de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ al cultivo de la microalga <i>H.pluvialis</i>	45
Figura 22. Representación gráfica de la concentración promedio expresada en $\mu\text{g}/\text{mL}$ de astaxantina en función del tiempo. La desviación estándar está representada por las barras de error.....	47

Figura 23. Comparación gráfica de la concentración celular y el contenido de astaxantina a una intensidad de luz de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	49
Figura 24. Comparación gráfica de la concentración celular y el contenido de astaxantina a una intensidad de luz de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	49
Figura 25. Curva de calibración utilizada para la determinación de las concentraciones de astaxantina durante los muestreos diarios a las diferentes intensidades de luz.	96
Figura 26. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, empleando el método DPPH.	113
Figura 27. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, empleando el método ORAC.....	115

LISTA DE ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS

AAPH	2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)dihidrocloruro.
cel/mL	Concentración celular por unidad de volumen.
°C	Grados Celsius.
DPPH	2,2-difenil-picril-hidracina.
g	Unidad de masa. Gramos.
g/mol	Masa por unidad de cantidad de sustancia. Masa Molar.
g/L	Concentración expresada en gramo por litro.
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
<i>H.pluvialis</i>	Haematococcus pluvialis.
Hz	Unidad de frecuencia. Hertz.
KNO ₃	Nitrato de potasio.
L	Unidad de volumen. Litro.
Lux	Unidad de medida para la intensidad de luz.
mg	Unidad de masa. Miligramos.
mg/mL	Concentración expresada en miligramo por mililitro.
mL	Unidad de volumen. Mililitro.
mL/min	Flujo expresado en mililitro por minuto.
mm	Unidad de longitud. Milímetros.
mm ²	Unidad de superficie. Milímetro cuadrado.
NaNO ₃	Nitrato de sodio
nm	Unidad de longitud. Nanómetros.

ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno.
pH	Unidad de medida de alcalinidad o acidez de una disolución.
psi	Unidad de presión. Libras por pulgada cuadrada.
rpm	Revoluciones por minuto.
W	Unidad de potencia eléctrica. Watt.
μm	Unidad de longitud. Micrómetros.
μL	Unidad de volumen. Microlitro.
μM	Concentración expresada en micromol por litro.
$\mu\text{mol/L}$	Concentración micromolar.
$\mu\text{mol/m}^2\text{s}$	Unidad de intensidad luminosa. Micromol por metro cuadrado por segundo.
%	Símbolo matemático, Porcentaje.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. Antecedentes y Justificación

En años recientes se ha incrementado el interés por el aprovechamiento de los recursos naturales desde un punto de vista sostenible. Actualmente, en muchas áreas de la ciencia, como biotecnología, farmacología, ciencia de los alimentos, por ejemplo; han ocurrido grandes avances, principalmente la creación de nuevos productos que ayudan a mejorar la salud de las personas, generando un mayor bienestar y a la vez seguridad y confianza al consumidor final ¹.

Existe una diversidad de fuentes para la obtención de compuestos biológicamente activos, tales como algas, bacterias, hongos, plantas, entre otras ². Los metabolitos secundarios son producidos en organismos que carecen de un sistema inmune como tal; la producción de éstos está directamente relacionada con una respuesta o un mecanismo de defensa, la cual aumenta la posibilidad de sobrevivencia ³. Sin embargo, no sólo cumplen esta función, algunos se encargan del transporte de compuestos de almacenamiento y la protección contra rayos ultravioleta. Uno de los atractivos de este tipo de compuestos es que son fuente principal de principios activos de fármacos, así como de productos químicos de valor agregado ⁴.

Se pueden encontrar una gran variedad de metabolitos secundarios en la naturaleza, en donde las sustancias de mayor interés para las industrias encargadas de la producción de compuestos naturales con fines comerciales se agrupan en terpenos y sus derivados, esteroides, lípidos, compuestos fenólicos, ácidos grasos y alcaloides ^{2,4}.

Ya que existe una amplia diversidad de plantas, éstas son una de las principales fuentes de obtención y de estudio de los compuestos químicos, sin embargo, otro tipo de fuentes, como las algas (tanto macro como micro) han llamado la atención ². Las algas representan uno de los grupos más numerosos que se encuentran en el océano; poseen una tasa de productividad alta, además que representan un recurso poco explotado a nivel investigativo ⁵.

Las algas y las microalgas poseen un crecimiento, un procesamiento y una posible cosecha rápida, pueden cultivarse en materiales de desecho; lo cual es una de las características que las hacen apropiadas para una mayor obtención de biomasa ⁶. Poseen requisitos simples para el crecimiento, particularidad que las vuelve una opción de materia prima atractiva, además, tienen la capacidad de adaptarse a diversos ecosistemas, es decir, medios salinos como el mar o en aguas residuales, siempre y cuando no existan compuestos químicos que inhiban su crecimiento celular ^{7,8}.

Las microalgas también son utilizadas para la eliminación del dióxido de carbono que se encuentra presente en la atmósfera, mediante el proceso de fotosíntesis, así como su uso actual en la producción de biocombustibles, los cuales son factores importantes que constituyen una alternativa para la implementación de tecnologías que mitiguen el calentamiento global, utilizando fuentes renovables ⁹.

Estos microorganismos producen una alta cantidad de compuestos químicos como proteínas, vitaminas, lípidos y pigmentos en forma de compuestos fenólicos, polisacáridos y carotenoides ¹⁰. Se ha comprobado que los pigmentos fotosintéticos extraídos de las microalgas cumplen diversas funciones, entre las cuales se pueden mencionar efectos antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antibióticos ¹¹. Es por ello por lo que se ha extendido con el paso de los años, el uso de estos en aditivos alimentarios, cosméticos y productos farmacéuticos ¹⁰.

Haematococcus pluvialis es una microalga verde que se encuentra en aguas dulces y es capaz de producir astaxantina (Figura 1) en grandes cantidades, que es el pigmento de mayor valor obtenido a partir de esta especie ¹².

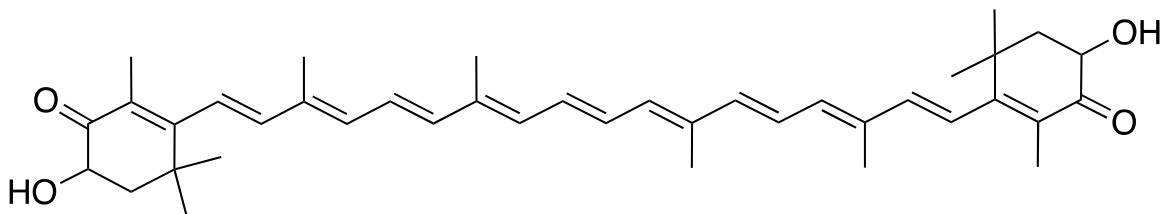


Figura 1. Estructura química de la astaxantina (Adaptada de Herrera-Andrade *et al*, 2011. ¹³).

La astaxantina es un carotenoide de color rojo, empleado usualmente en la industria acuícola; para otorgarle color a la carne de pescado de diversas especies, entre ellas el

salmón, las langostas y los cangrejos. También es utilizado como suplemento alimenticio para las gallinas con el fin de conferir un color más atractivo a las yemas de los huevos ¹⁴.

Se considera a la astaxantina como un compuesto antioxidante y que posee efectos antiinflamatorios. Estudios realizados indican que este pigmento es útil para reforzar el sistema cardiovascular, más específicamente protege contra la enfermedad cardiovascular aterosclerótica ¹⁵. Además, produce una serie de beneficios, como mejorar la salud ocular, proteger a la piel contra los rayos ultravioleta y mejora la recuperación del organismo después de realizar ejercicio ¹⁶.

En el 2014, la producción mundial de carotenoides alcanzó 1.5 mil millones de dólares, con una tasa de crecimiento anual del 3 % ¹⁷. La astaxantina es uno de los pigmentos más reconocidos e importantes y su producción ocupa alrededor de la mitad del mercado mundial de las industrias que se dedican a la elaboración de este tipo de compuestos ¹⁷. En el 2018 se reportó una ganancia de más de \$100 millones para el mercado que se encarga de la producción de astaxantina, debido a que los productos que contienen este compuesto se han vuelto mucho más populares por sus beneficios para la salud humana ¹⁶.

A nivel nacional, se han realizado estudios acerca de algunos tipos de especies de microalgas que existen en ríos y costas marinas de Costa Rica, principalmente para la determinación de la calidad del agua como bioindicadores de contaminación, así como el uso de éstas para procesos de biorremediación de suelos y aguas residuales ¹⁸⁻²⁰; sin embargo, la obtención de pigmentos sigue sin ser explotada.

Es por lo anterior que la presente investigación se centra en evaluar la mayor producción de astaxantina, empleando la microalga *H. pluvialis* y determinar las mejores condiciones de cultivo a nivel de laboratorio, ya que la generación de este tipo de carotenoide cuenta con una alta demanda de comercialización. Por otro lado, ésta es una investigación base que servirá como complemento para la futura elaboración de productos de alto valor agregado y de interés comercial que beneficien la salud humana, factor importante para un país en vías de desarrollo.

2. Marco Teórico

2.1. Algas: descripción general

Las algas comprenden un grupo muy amplio y heterogéneo de organismos. La definición de este término suele confundirse generalmente con que estos seres vivos son plantas marinas. Considerarlas como tales es un error muy frecuente, debido a que las algas pueden incluso existir en ambientes alejados del mar, y a pesar de poseer una similitud con las plantas terrestres, tampoco se consideran como tales ya que carecen de raíces, hojas y tallos ²¹.

Concretamente las algas son organismos autótrofos fotosintéticos, es decir que son capaces de producir su propio alimento a partir de radiación solar mediante fotosíntesis ²¹. Debido a que son un grupo altamente especializado y dado que poseen una estructura multicelular; pueden adaptarse a diversos hábitats o ambientes ecológicos, donde crecen y se reproducen ²².

Existe una gran variedad de algas con diferencias marcadas. Estos organismos pueden clasificarse al tomar en cuenta varios factores, como por ejemplo el tamaño, la morfología o el color ^{2,21}. Según su morfología, se pueden encontrar organismos unicelulares microscópicos, filamentosos simples o ramificados ²¹. Con respecto a su color, éstas se agrupan en tres categorías: algas verdes, rojas y marrones ². De acuerdo con su tamaño, las algas se catalogan en dos grupos: las microalgas que son organismos unicelulares microscópicos y las macroalgas que son parecidas a las plantas terrestres ²¹.

Sin embargo, para una mayor comprensión de la clasificación de estas, se muestra el siguiente cuadro resumen.

Cuadro 1. Clasificación de las algas y sus principales características ²¹.

Organización	Clase	Características
Microalgas	Diatomophyceae	Diatomeas unicelulares con 1 o 2 flagelos. Paredes de silicio muy resistentes.
	Dinoflagellata	Flagelados. Parte del plancton marino.
	Cyanobacteria	Algas verdes-azuladas. Unicelulares o coloniales.
Microalga/macroalga	Chlorophyceae	Algas verdes. Unicelulares o pluricelulares. La mayoría de agua dulce.
Macroalgas	Rhodophyta	Algas rojas. Pluricelulares en tejidos especializados. Casi todas son marinas.
	Phaeophyceae	Algas marrones. Casi todas son marinas. Algunas de las algas de mayor tamaño.

Una de las características más importantes de las algas es que con la ayuda de otras especies, se encargan de producir alrededor del 80 % del oxígeno presente en la atmósfera terrestre, es por ello que se considera a los océanos como “Pulmones de la Tierra” ²³.

A nivel ecológico, las algas poseen roles parecidos a las plantas; una de sus funciones es servir como indicadores biológicos de la calidad del agua; por otro lado ciertos tipos de algas son utilizadas para técnicas de biorremediación, las cuáles se llevan a cabo mediante procesos de bioacumulación y bioabsorción ²⁴.

De las algas se pueden obtener una amplia e interesante cantidad de compuestos químicos como los ácidos grasos, especialmente los poliinsaturados, lípidos, carotenoides, proteínas y compuestos fenólicos ².

2.2. Microalgas y sus características

Las microalgas forman parte de los organismos vivos que habitaron el planeta Tierra desde hace millones de años. Poseen diferentes tamaños, pueden ser unicelulares o pluricelulares y se caracterizan por tener pigmentos como la clorofila y los carotenoides. Debido a la gran variedad existente, estas suelen clasificarse según su estructura y según la coloración de los pigmentos que la conforman (Tabla 1) ²⁵.

A causa de los cambios climáticos que se han presentado en los últimos años, estos microorganismos han evolucionado y se han adaptado a diferentes ambientes para su supervivencia; como salinidad, cambios de temperatura, sequedad, medios anaeróbicos, fotooxidativos, etc ²⁶.

Las microalgas son consideradas como la base de la cadena alimenticia de los diferentes ecosistemas marinos y poseen la capacidad de absorber agua y dióxido de carbono por medio de la luz solar, para la producción de compuestos químicos muy complejos que pueden mantenerse dentro de la célula o liberarse al medio ²⁶. Debido a su estructura unicelular hacen un mejor uso de la luz solar, así como de la absorción de nutrientes, por eso se dice que son cuatro veces más eficientes que las plantas en transformar la energía lumínica en química ²⁷.

La producción de biomasa microalgal es el resultado de la interacción de diversos factores físicos, químicos y biológicos. El crecimiento óptimo de cada especie está determinado por parámetros fisicoquímicos como temperatura, radiación, nutrientes, salinidad y pH ²⁷.

Como se mencionó anteriormente, estos organismos tienen un crecimiento acelerado cuando poseen las condiciones adecuadas. Es por ello que actualmente han sido de gran importancia para muchas industrias, debido a la generación de metabolitos secundarios de origen natural, entre ellos los carotenoides, que son utilizados en su mayoría como colorantes naturales y agentes antioxidantes ^{27,28}.

2.2.1. *Haematococcus pluvialis*

H. pluvialis es una microalga verde unicelular que se encuentra en aguas dulces, posee un tamaño celular que va desde los 8 μm hasta los 50 μm ^{27,29}. Suele encontrarse en las zonas

templadas del planeta, ya que éstas poseen las características necesarias que favorecen su crecimiento y, por ende, su reproducción ²⁹.

Tiene la peculiaridad de poseer dos fases o estados de crecimiento. La fase inicial se conoce como la fase verde o fase vegetativa y la fase roja, donde se da la producción de astaxantina. En la naturaleza se puede encontrar de color rojizo, ya que las células reaccionan de esta manera para protegerse de los rayos ultravioleta que provienen de la radiación solar (Figura 2) ²⁹.

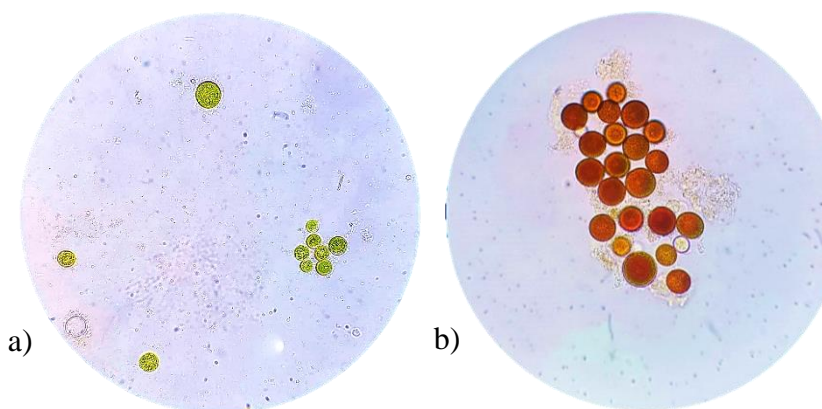


Figura 2. Fases o estados de crecimiento de la *H.pluvialis*, a) fase verde y b) fase roja, observada al microscopio a 40X (Imágenes propias tomadas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas; LABMA, UNA; adaptada de Han *et al*, 2013. ³⁰).

A esta microalga también se le conoce como *Haematococcus lacustris* o *Sphaerella lacustris* ²⁷. En el Cuadro 2 se muestra su clasificación taxonómica.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de la microalga *H.pluvialis* ²⁷.

Clase	Chlorophyceae
Orden	Volvocales
Familia	Haematococcaceae
Género	<i>Haematococcus</i>
Especie	<i>Pluvialis</i>

La *H. pluvialis* presenta cuatro tipos de células: microzooides, macrozooides, palmela y hematocistos o aplanosporas. Los gametos o las células reproductivas son conocidos como los microzooides, presentan tamaños inferiores a los 10 μm y una gran motilidad ³⁰.

En su etapa vegetativa se encuentran la mayoría de macrozooides debido a que la microalga posee condiciones de crecimiento favorables ³⁰. Estas células tienen dos flagelos que le confieren movimiento, un cloroplasto en forma de copa, pirenoides, citoplasma que se encuentra rodeado por una capa gelatinosa ³¹. Presentan la característica de crecer rápidamente y se dividen por mitosis desde dos hasta ocho células hijas ³⁰. En esta etapa las células están compuestas principalmente de carotenoides primarios como luteína, violaxantina, neoxantina y zeaxantina; además de clorofila *a* y *b* ²⁷.

En una etapa posterior a la mitosis, cuando las condiciones de cultivo son desfavorables, las células pierden su movilidad, ya que sus flagelos desaparecen, es decir, se transforman a su etapa palmelar. Posteriormente, se crean las aplanosporas que son esporas asexuales que no poseen movimiento y que se encargan de acumular astaxantina y otros carotenoides secundarios (Figura 3) ^{30,31}.

La morfología de esta microalga cambia, aumentando su tamaño hasta 50 μm y se da la formación de una pared celular gruesa (Figura 3) ^{27,31}.

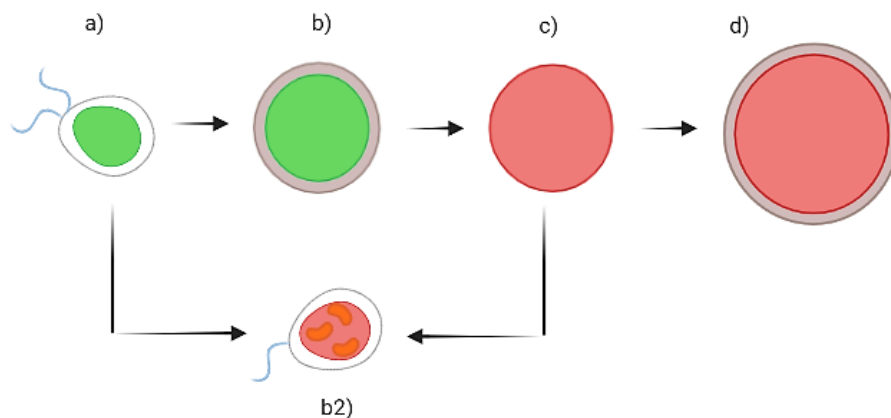


Figura 3. Esquema representativo de la morfología de *H. pluvialis* durante la exposición a condiciones de estrés: (a) etapa vegetativa, (b) fase palmelar, (b2) flagelados acumuladores de astaxantina, (c) transición a la forma de aplanospora y (d) aplanosporas ricas en astaxantina (Adaptada de Posten and Walter, 2012. ³¹).

El ciclo celular está caracterizado por poseer las cuatro etapas mostradas en la Figura 3, sin embargo, la duración de cada etapa está determinada por las condiciones de cultivo ³² y por factores de estrés, entre ellos la intensidad lumínica, deficiencia de nutrientes, principalmente nitrógeno, fosfatos y sulfatos ²⁹.

2.3. Cuantificación del crecimiento en microalgas

Para tener un control exhaustivo del crecimiento de los microorganismos, es indispensable evaluar su comportamiento. Al igual que las bacterias y las levaduras, las microalgas se reproducen por división celular, por lo tanto, es posible monitorearlas con diversas técnicas, la más utilizada es observar su velocidad de crecimiento poblacional mediante una curva de crecimiento ³³.

Con base en las curvas de crecimiento se pueden identificar las fases por la cual se encuentra un cultivo, así mismo, permiten evaluar la incidencia de parámetros externos en el crecimiento celular. Estas curvas están conformadas por cinco fases, como se observa en la figura 4 ³⁴.

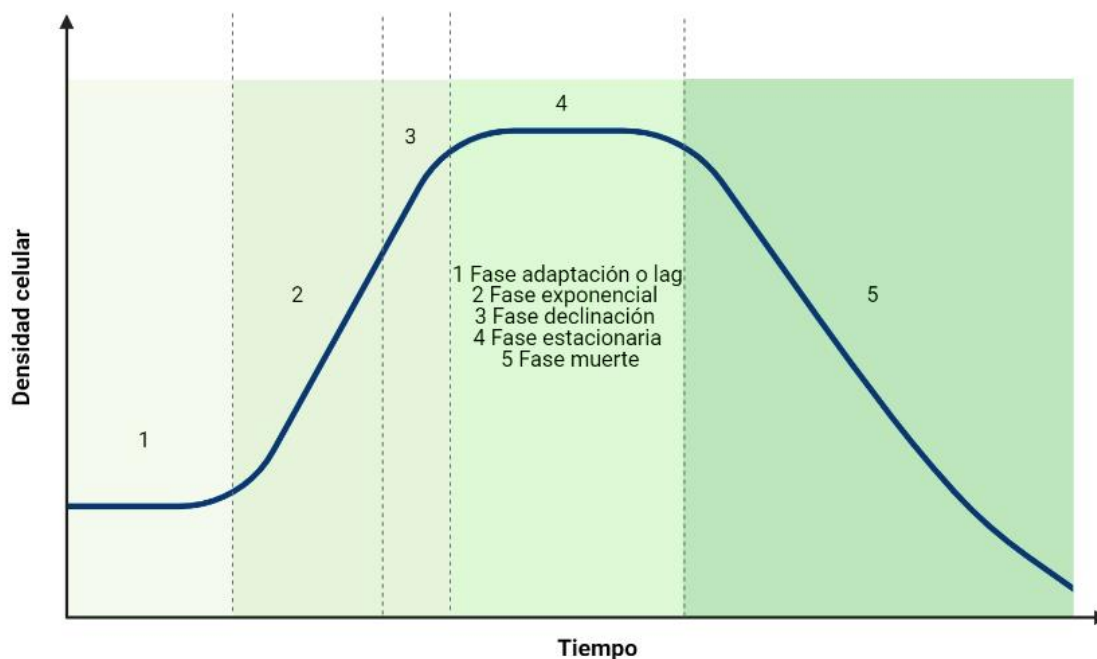


Figura 4. Etapas o fases de las curvas de crecimiento de las microalgas (Adaptada de Salgueiro, 2018. ³⁴).

Según la figura 4, en la primera fase (1) se da una adaptación de las células a las condiciones del medio de cultivo donde se encuentran, esta fase se caracteriza por poseer un pequeño incremento de la densidad celular del microorganismo ³⁴ ya que las células se ajustan fisiológicamente a los cambios de nutrientes ³⁵.

Posteriormente, las células comienzan a entrar en la fase exponencial (2), donde se da un crecimiento acelerado de la población debido a la constante y la rápida división celular ³⁴. En este caso, ningún factor o variable como nutrientes o luz visible, influye en la etapa de reproducción ³⁵.

Al final de la fase exponencial empiezan a darse limitaciones que influyen de manera directa con el crecimiento celular. Se inicia la escasez de los nutrimentos en el medio de cultivo y al haber una alta población de individuos, la luz no llega a cada una de las células, variable indispensable para el crecimiento de las microalgas, debido a que son organismos fotosintéticos. Por tal motivo, el crecimiento disminuye considerablemente ^{34,35}. Esta fase se conoce como declinación (3).

La fase estacionaria (4) se distingue porque la tasa de crecimiento se iguala a la mortalidad, por lo tanto, la densidad celular se mantiene sin cambios relevantes ³⁴. En este caso, el cultivo ha alcanzado su concentración celular máxima ³⁵.

En la etapa (5) o la fase de muerte, se genera un colapso final del cultivo, donde las células comienzan a morir, ya que las mismas empiezan a acumular sustancias tóxicas y se da la liberación de estas sustancias al medio de cultivo, inhibiéndolas. Por lo tanto, la densidad celular decae súbitamente ^{34,35}.

2.3.1. Monitorización del crecimiento celular

En la actualidad se emplean diversos métodos para el monitoreo del crecimiento celular de las microalgas, los cuales pueden ser expresados en concentraciones de biomasa o de algún compuesto químico de interés ³³. Entre los principales métodos que se utilizan están: cantidad de proteína, peso seco, métodos de fluorescencia, métodos espectrofotométricos que se utilizan para medir clorofila *a* y volumen de células ^{33,34}.

De los métodos antes mencionados el que se utiliza con mayor frecuencia a nivel del laboratorio es el recuento celular, debido principalmente a que es de bajo costo y muy sencillo de aplicar. Además, permite una mejor visualización del cultivo que se tiene bajo estudio. Sin embargo, para obtener datos o resultados mucho más confiables, es indispensable aplicar al menos dos métodos simultáneos, para darle seguimiento al crecimiento celular de un determinado microorganismo ³³.

El recuento celular también es conocido como un método directo, en el cual se emplea una cámara de Neubauer, para llevar a cabo el conteo de las células que están presentes en la cuadrícula de esta, de esta forma se estima el contenido de biomasa por unidad de volumen ³⁴.

Una vez que se posee conocimiento de la etapa en la cual se encuentra un cultivo en tiempo real, pueden tomarse las decisiones necesarias para producir los diferentes metabolitos secundarios, aplicando factores de estrés. La intensidad lumínica, por ejemplo, es un factor indispensable y crucial para la producción de metabolitos, ya que funciona como un estímulo para la producción de este tipo de compuestos en las microalgas verdes ³².

2.4. Biomasa microalgal

La biomasa algal está compuesta principalmente de pigmentos fotosintéticos, especialmente de carotenoides, clorofilas, xantofilas y ficobiliproteínas, que poseen gran relevancia en la industria comercial, ya que son utilizados como colorantes naturales. También, presentan cierta cantidad de polisacáridos, lípidos y biomoléculas como enzimas y toxinas, de diversa naturaleza y aplicación ³⁶. En la figura 5 se observa una serie de aplicaciones de la biomasa microalgal.

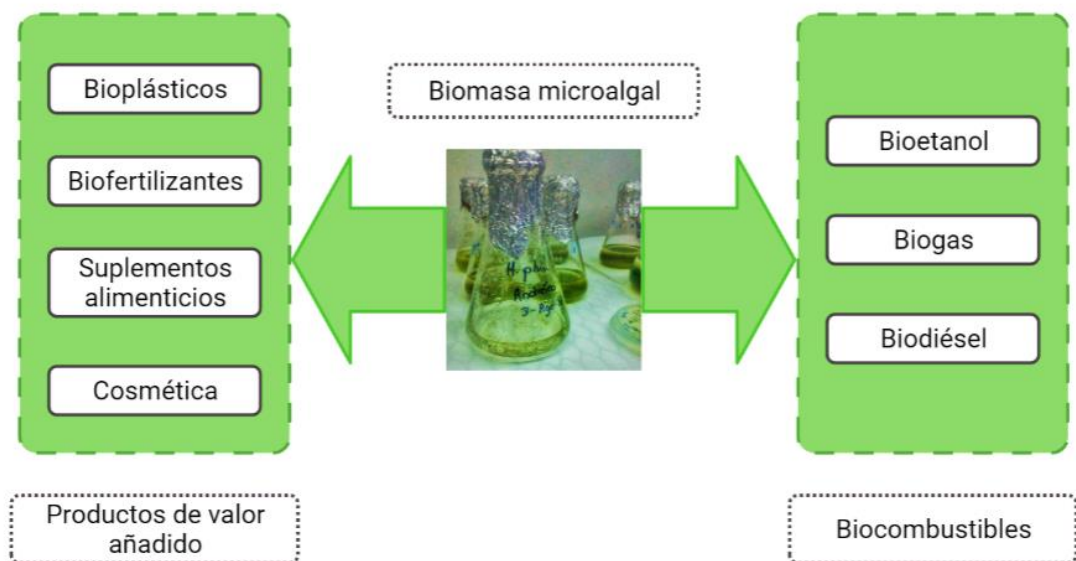


Figura 5. Posibilidades de aprovechamiento de un cultivo de microalgas (Adaptada de Salgueiro, 2018. ³⁴).

La composición porcentual de estos compuestos químicos varía según la especie utilizada o estudiada, así como de las condiciones que favorecen específicamente su crecimiento ³⁶.

La obtención de metabolitos secundarios a partir de microalgas está determinada principalmente por las condiciones de estrés bajo las cuales se mantienen cultivadas. Esta es una de las principales ventajas que presenta la generación de biomasa algal, ya que la aceleración del metabolismo secundario de estos microorganismos permite la obtención de compuestos biológicamente activos en periodos de tiempo más cortos ⁷.

2.4.1. Carotenoides

Los carotenoides son compuestos lipofílicos que se caracterizan por poseer colores rojos, amarillos y naranjas, son de gran importancia y se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza ^{37,38}. Hasta el día de hoy, se conocen alrededor de 700 tipos de carotenoides que se pueden hallar en plantas (frutos, semillas, raíces), animales (moluscos, insectos, mamíferos, aves), algas, hongos y una variedad de microorganismos ³⁹.

Están formados por unidades de isopreno (Figura 6), el cual es su precursor biosintético ⁶. Sin embargo, todos comparten una estructura básica (Figura 7) de 40 carbonos, donde sus

grupos terminales, identificados como R y Y son los que cambian para dar la identidad química de cada uno ³⁹.

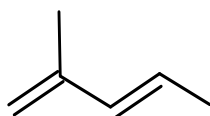


Figura 6. Estructura química del isopreno (Adaptada de Ceausescu, 1984. ⁴⁰).

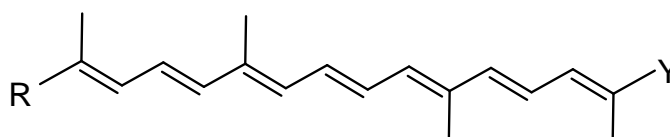


Figura 7. Estructura química básica de un carotenoide (Adaptada de Amorim-Carrilho *et al*, 2014. ⁴¹).

Los carotenoides se dividen en dos grandes grupos: carotenos y xantofilas. Las xantofilas son compuestos oxigenados, en su estructura presentan grupos hidroxilo (-OH) y grupos ceto (C=O) posicionados en sus anillos terminales ⁶, mientras que los carotenos carecen de átomos de oxígeno ⁴¹.

Debido a la presencia de dobles enlaces en las estructuras de los carotenoides, éstos adquieren diferentes configuraciones como la *cis* o la *trans* determinando de esta manera su naturaleza química ⁶. Además, esta estereoquímica establece la coloración, la forma, la reactividad y el comportamiento en procesos de transferencia de energía ³⁹.

Los carotenoides tienen diversos roles en el sistema humano, pueden actuar como antiinflamatorios, antioxidantes, antienvjecimiento, reparadores y son muy utilizados para prevenir el cáncer de piel, ya que se usan como fotoprotectores contra los rayos ultravioleta provenientes de la radiación solar. Además, se emplean como ingredientes nutracéuticos y en cosmética para la prevención de enfermedades degenerativas relacionadas o causadas por el estrés oxidativo del organismo ⁴².

Es importante recordar que los carotenoides son compuestos sensibles a la luz, a cambios de temperatura (principalmente las temperaturas altas) y a la presencia de oxígeno. Estas variables hacen que los mismos sean difíciles de manipular y almacenar, por lo tanto, es indispensable mantener condiciones controladas ⁶.

2.4.1. Astaxantina

La astaxantina puede ser producida por diferentes microorganismos: microalgas, bacterias incluso levaduras, asimismo, se puede hallar en vertebrados e invertebrados marinos. Los animales no pueden producirla, sin embargo, la obtienen por medio de la dieta, es por ello que también se encuentra a la astaxantina en salmones, camarones, langostas y pescados, la cual le otorga ese tono naranja-rojizo en la superficie del organismo ⁴².

Además, tiene muchas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia. Puede fabricarse mediante síntesis química y a partir de recursos naturales. Actualmente, la astaxantina que es elaborada sintéticamente ha restringido su uso en alimentos saludables por la FDA de los Estados Unidos, ya que presenta una baja biodisponibilidad y seguridad. Por tal razón, el aprovechamiento de fuentes naturales para la obtención de compuestos biológicamente activos ha adquirido mayor relevancia ⁴³.

En la siguiente figura se observan algunos de los usos que se le atribuyen a dicho compuesto.

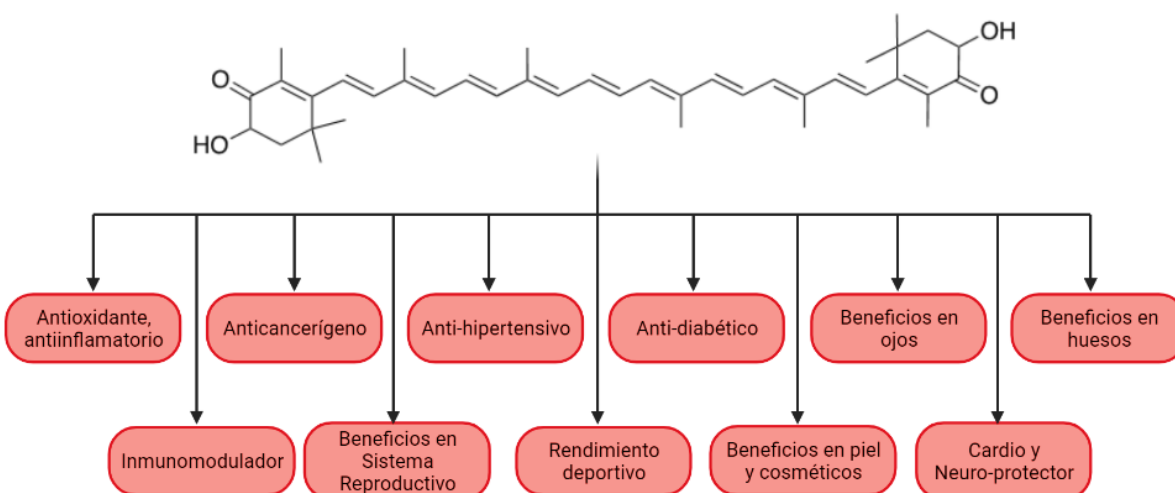
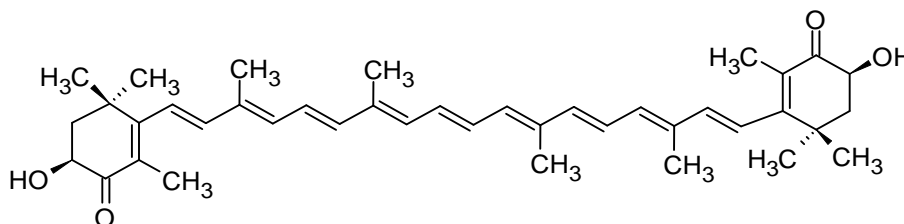


Figura 8. Propiedades atribuidas a la astaxantina (Adaptada de Fakhri *et al*, 2018. ⁴⁴).

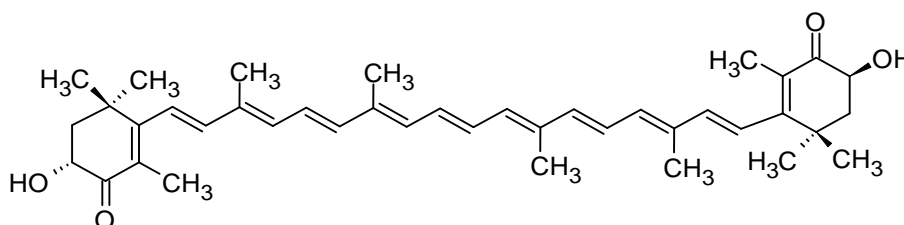
La astaxantina pertenece a la familia de las xantofilas, posee la fórmula molecular $C_{40}H_{52}O_4$, tiene una masa molecular de 596,84 g/mol y se le conoce químicamente como 3,3'-dihidroxi-4,4'-diaceto- β - β -caroteno ^{13,45,46}.

Se puede encontrar en la naturaleza como estereoisómeros (Figura 9), isómeros geométricos, esterificados y en su forma libre. Los más abundantes son 3*S*, 3'*S* y 3*R*, 3'*R* ⁴⁵.

(3*S*,3'*S*)-Astaxantina



(3*R*,3'*S*)-Astaxantina



(3*R*,3'*R*)-Astaxantina

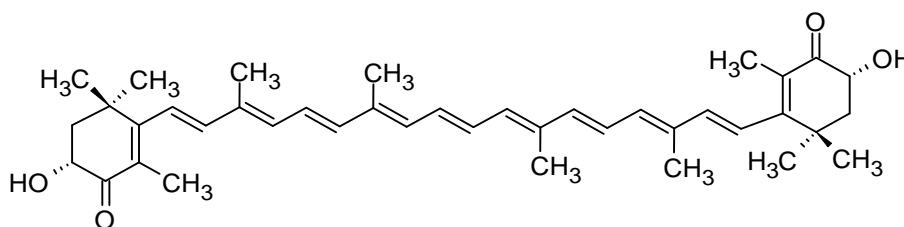


Figura 9. Estereoisómeros de astaxantina (Adaptada de Galasso *et al*, 2018. ⁴²).

Como se observa en la figura 9, la astaxantina posee dos grupos hidroxilos en sus anillos terminales, éstos reaccionan con los ácidos grasos de cadena larga que se encuentran en las células de la microalga y pueden formar monoésteres (es decir, que reaccione sólo uno de sus grupos -OH) o diésteres ⁴⁵.

Con respecto a la *H.pluvialis*, ésta produce alrededor del 70 % de astaxantina monoesterificada, sólo un 5 % se encuentra en su forma libre y aproximadamente un 25 % se produce como astaxantina diesterificada ²⁸. En la figura 10, también se muestra el contenido de astaxantina procedente de otro tipo de especies o microorganismos. Se han reportado en estudios anteriores que 1 g de biomasa de esta microalga genera 10 mg de astaxantina aproximadamente ²⁷.

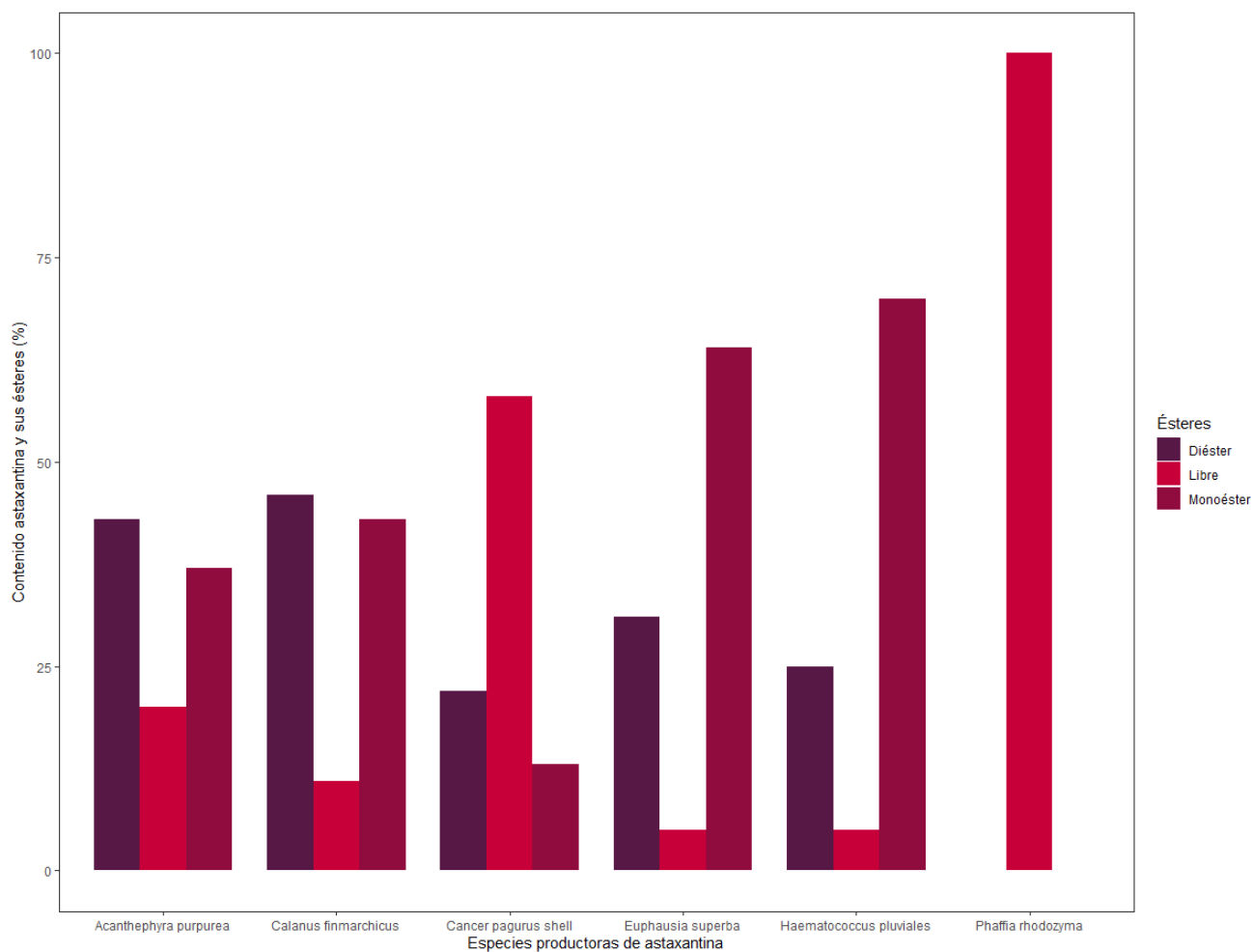


Figura 10. Producción de astaxantina y sus ésteres según cada especie (Adaptada de Reyes *et al*, 2014; Ambati *et al*, 2014. ^{28,45}).

2.5. Radicales libres, antioxidantes y actividad antioxidante

En el metabolismo oxidativo de los seres vivos se originan a menudo especies oxigenadas que se encuentran parcialmente reducidas, nombradas como radicales libres o conocidas como especies reactivas de oxígeno ^{47,48}. En una definición más exacta, un radical libre puede existir como un átomo o una molécula, la cual posee uno o más electrones desapareados en la capa de valencia o en su órbita exterior ⁴⁹.

Debido a la falta de electrones, los radicales libres son muy inestables y de corta duración. Además, suelen ser mucho más reactivos y se convierten en sustancias sumamente tóxicas para el organismo ^{48,49}. Sin embargo, estos compuestos poseen beneficios para el organismo; en concentraciones moderadas, están encargados de las funciones inmunológicas, es decir, contra la defensa de microorganismos patógenos que causan daños al sistema, participan en una serie de vías de señalización celular, respuesta mitogénica y en la regulación redox ⁴⁹.

Los radicales libres sufren reacciones en cadena y siguen un proceso muy variado hasta su estabilización. Durante esta serie de procedimientos se genera una afectación de las macromoléculas que están presentes en los organismos de los seres vivos ⁴⁷; como lípidos, ácidos nucleicos y proteínas ⁴⁸, causando de esta manera incluso estados patológicos y enfermedades degenerativas (Figura 11). La acumulación de enzimas inactivas y proteínas lesionadas debido a la oxidación provoca daño a las membranas de las células y con esto el envejecimiento celular ⁴⁷.

Dichos compuestos se generan a partir de fuentes endógenas y exógenas, entre las fuentes endógenas se encuentran diferentes órganos celulares como las mitocondrias y el retículo endoplasmático, ya que en estos órganos hay un gran consumo de oxígeno ⁴⁹.

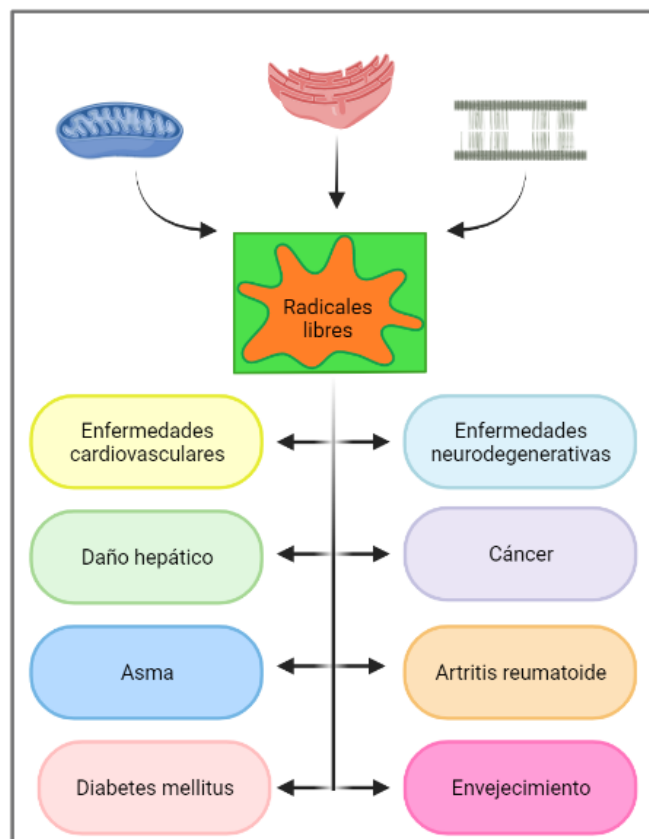


Figura 11. Fuentes y patologías asociadas a la generación de radicales libres (Adaptada de Hekimi *et al*, 2011; Phaniendra *et al*, 2015.^{48,49}).

Para mitigar estos efectos adversos existen los antioxidantes, compuestos que se encuentran presentes en diversos alimentos y una vez que ingresan al cuerpo en concentraciones bajas retardan, controlan y previenen los procesos oxidativos⁵⁰. Estos agentes reductores se encargan de inhibir las reacciones en cadena propiciadas por los radicales libres, ya que se oxidan ellos mismos. De igual manera son utilizados para la reparación de biomoléculas que se encuentran parcialmente dañadas⁴⁷.

La capacidad que poseen algunos compuestos químicos para la eliminación de estos radicales de oxígeno o la reducción química de compuestos oxidados, se conoce comúnmente como actividad antioxidante⁴⁷.

Los carotenoides están dentro de los compuestos que presentan una gran actividad antioxidante; generan efectos positivos en la salud, muestran una amplia versatilidad y variedad. La presencia de grupos hidroxilos en la estructura molecular influye sobre la

capacidad de estabilizar los radicales libres debido a su alto grado de reactividad, asimismo sus dobles enlaces conjugados también incrementan el poder antioxidante ^{47,51}.

2.5.1. Métodos para determinación de actividad antioxidante

La determinación de actividad antioxidante generalmente se evalúa mediante factores cinéticos y estequiométricos; es decir, se hace referencia a cuánto tiempo tarda el antioxidante en cuestión en suprimir el proceso de oxidación. Estos métodos básicamente se encargan de establecer la cantidad de radicales libres que se pueden eliminar. Existe gran variedad de metodologías para determinar la capacidad antioxidante de un compuesto en específico; cada una con sus ventajas y desventajas ⁵².

Los métodos para la determinación de la actividad antioxidante se clasifican según su mecanismo de reacción en dos grupos: los basados en la transferencia de átomos de hidrógeno y los de transferencia de electrones. En el primero de ellos, se lleva a cabo un proceso competitivo, en donde el sustrato y el antioxidante compiten por los radicales peroxilo. En el segundo caso se mide la capacidad de reducción de un oxidante mediante cambios de coloración ⁵³.

2.5.1.1. Método DPPH: 2,2-difenil-picril-hidracina

Es uno de los métodos más utilizados para determinar y evaluar la capacidad antioxidante de algún extracto, dejando de lado la actividad enzimática; es un método sencillo, rápido y de bajo costo ⁵⁴.

Está basado en la reducción del radical DPPH, el cual posee una coloración violeta que al reaccionar con los compuestos antioxidantes de la muestra cambia su coloración a un tono amarillo, la reacción está representada por la figura 12 ⁵⁴.

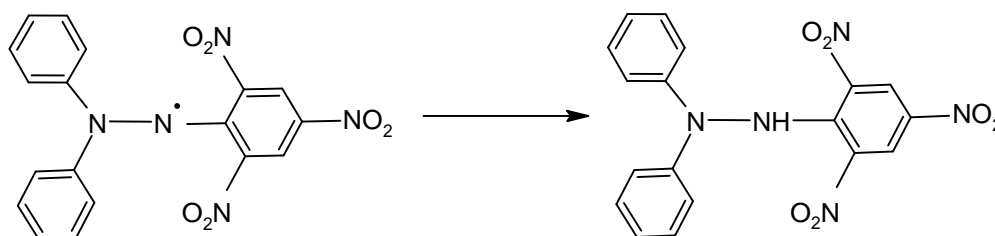


Figura 12. Reacción del radical DPPH para la determinación de la capacidad antioxidante (Adaptada de Mateos-Martín, 2013. ⁵⁴).

A pesar de ser un método ampliamente usado, posee diversos inconvenientes debido a que hay muchos compuestos que absorben a la misma longitud de onda en la cual se lleva a cabo el análisis, un ejemplo de esto son los carotenoides, que pueden ser una interferencia a la hora de expresar los resultados obtenidos, por lo tanto, es fundamental emplear otro tipo de método como complemento ⁵⁴. Los resultados son expresados como el porcentaje de inhibición, es decir la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto empleado ⁵⁵.

2.5.1.2. Método ORAC: Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno

Este método es más efectivo que el anterior, tanto así que es uno de los más usados por los investigadores que tienen a cargo, estimar la actividad antioxidante de alimentos y bebidas que son consumidos especialmente en los Estados Unidos ⁵⁶.

Se emplea tanto en entornos hidrofílicos como lipofílicos. En este caso se hace uso del radical AAPH (Figura 13), los peróxidos originados por la descomposición térmica de este reaccionan con la fluoresceína inhibiéndola, si hay presencia de antioxidantes estos se encargan de neutralizar los radicales libres y de esta manera retrasan la pérdida de fluorescencia ⁵⁴.

La fluorescencia es medida durante dos horas aproximadamente hasta la pérdida del 5% de su valor inicial. Para determinar la concentración de antioxidantes se cuantifican las áreas bajo las curvas en todas las cinéticas analizadas, los resultados son expresados como equivalentes de trólox o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico ⁵⁴. Los valores obtenidos permiten obtener un índice ORAC con base a estos compuestos de referencia ⁵⁶.

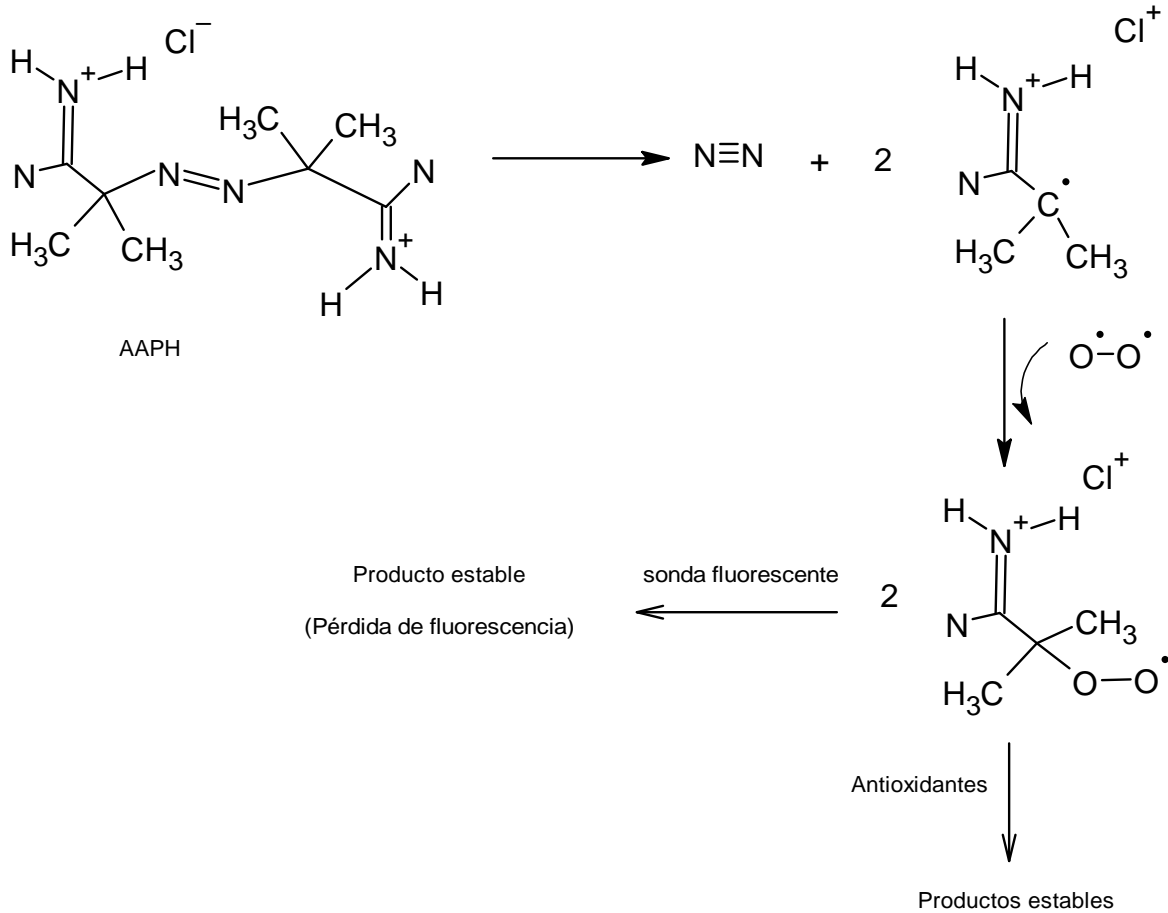


Figura 13. Reacción del radical AAPH mediante el método de ORAC (Adaptada de Zulueta *et al*, 2009. ⁵³).

CAPÍTULO II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la producción de astaxantina en la microalga *Haematococcus pluvialis* con miras al escalamiento en un fotobiorreactor helicoidal.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar la cinética de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo condiciones controladas en el laboratorio.
2. Definir el efecto de las variaciones de la intensidad de luz sobre la producción de astaxantina en la microalga *Haematococcus pluvialis*.
3. Estimar la actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis*, por los métodos DPPH y ORAC.

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Obtención de la microalga *Haematococcus pluvialis*

La microalga fue facilitada por el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas (LABMA) de la Universidad Nacional de Costa Rica, perteneciente a la Escuela de Ciencias Biológicas. La misma fue adquirida de la Universidad de Texas, en Estados Unidos; por el señor Jorge Ramírez; quién trabajó de la mano con el LABMA.

3.2. Curvas de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis*

3.2.1. Preparación del inóculo

Una muestra de algas se puso a crecer en el medio de cultivo BG-11 (Anexo 1) a pH 7,40, debidamente autoclavado durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi ^{11,57}. Las mismas mantuvieron fotoperiodos de luz cada 12 horas con una intensidad de 1200 lux o 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, la cual fue suministrada por lámparas fluorescentes de 18 W.

Inicialmente se utilizó una cantidad de 10 mL de medio de cultivo inoculado; posteriormente se escaló hasta obtener aproximadamente 1 L de medio, que contenía la biomasa algal necesaria para dar inicio con la elaboración de las curvas de crecimiento. Determinando previamente la concentración celular inicial, de 0,73 g/L.

3.2.2. Curva de crecimiento bajo condiciones iniciales

Las cepas fueron cultivadas por triplicado en erlenmeyers de 2 L, utilizando el medio de cultivo antes mencionado; las cuales fueron identificadas como C₁, C₂ y C₃.

Se empleó una concentración inicial de 0,15 g/L en cada sistema de cultivo ³³; tomando una alícuota de 164 mL de inóculo y completando con 636 mL de medio de cultivo autoclavado, obteniendo un volumen final de 800 mL en cada erlenmeyer.

Todos los sistemas de cultivo mantuvieron las mismas condiciones experimentales: un pH inicial de 7,40, temperatura de 25 °C, intensidad de luz continua de 70-72 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ o 4300-4500 lux y suministro de aire las 24 horas, asistido por una bomba con el fin de mantener una concentración de dióxido de carbono de 3-5%.

Para llevar a cabo la elaboración de las curvas de crecimiento se tomaron muestras diarias en un periodo de 13 días y se realizaron los análisis respectivos de peso seco y conteo celular; hasta obtener los datos necesarios y proceder con la realización de las gráficas.

3.2.2.1 Curva de crecimiento basada en peso seco

Se tomó una alícuota de 5 mL (por triplicado) de cada uno de los sistemas de cultivo C₁, C₂ y C₃. Las mismas se filtraron usando filtros de 0,22 micras de nanocelulosa; los cuales fueron pretratados previamente en un horno a 120 °C durante 2 horas, posteriormente se llevaron a un desecador por un tiempo de 30 minutos³³. Finalmente se pesaron para obtener la masa inicial.

Una vez filtradas las muestras, los filtros se secaron siguiendo el procedimiento anterior, obteniendo su peso final. Por medio de la medición de pesada por diferencia, se obtuvo el peso de la biomasa algal durante cada día, durante el periodo de muestreo.

3.2.2.2 Curva de crecimiento basada en conteo celular

Para realizar el conteo celular diario se hizo uso de una cámara de Neubauer⁵⁸. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada sistema C₁, C₂ y C₃, a los cuales se les agregó 2 gotas de Lugol como fijador. Posteriormente se llenó la cámara con el portaobjetos ya puesto y con la ayuda de una micropipeta se procedió a depositar la muestra homogenizada mediante agitación, evitando inundar los canales laterales de la misma. Una vez realizado esto, se procedió a observar al microscopio para llevar a cabo el conteo por triplicado de cada sistema de cultivo C₁, C₂ y C₃. El conteo celular se hizo contando únicamente las células que quedaron dentro de las cuadrículas identificadas como A, B, C y D; que se observan en la figura 14³³.

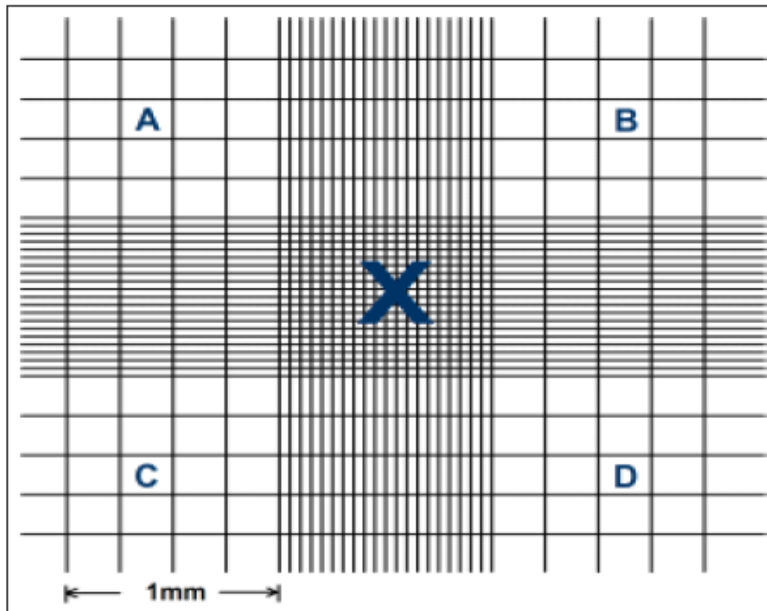


Figura 14. Representación de las reglillas de la cámara de Neubauer (Tomada de Arredondo and Voltolina, 2017.³³).

Finalmente se calculó la concentración en cada repetición, expresada como la concentración celular media reportada; es decir, cel/mL utilizando la siguiente fórmula.

$$C = N * 10^4 * dil$$

Donde:

C = concentración celular expresada como cél/mL

N = Promedio de células presentes en 1 mm² o 0,1 µL

dil = Factor de dilución, en caso de que fuera necesario; sin embargo, en todos los casos de conteo realizado no se realizó ninguna dilución de la muestra³³.

A partir de los datos generados se procedió a la realización de las gráficas de concentración celular en función del tiempo.

Además, se calculó la tasa de crecimiento y tiempo de duplicación o generación de las curvas bajo condiciones iniciales; aplicando las siguientes ecuaciones:

Tasa de crecimiento (μ)

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_i)}{(t_f - t_i)}$$

Donde N es la densidad celular (cel/mL) tomando en cuenta el tiempo establecido como final (f) e inicial (i) ⁵⁹.

Tiempo de duplicación o tiempo de generación (Tg)

$$Tg = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En el caso anterior, el tiempo también se puede expresar en horas o días ⁶⁰.

3.2.3. Curvas de crecimiento con respecto de las variaciones de intensidad de luz

3.2.3.1 Curva de crecimiento usando 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

A partir de un inóculo de concentración 1,02 g/L, se procedió a realizar los cálculos respectivos para el montaje de 3 sistemas de cultivo con una concentración de 0,15 g/L ³³. Durante los primeros 9 días los sistemas se mantuvieron con las condiciones experimentales iniciales hasta obtener la mayor producción de biomasa determinada en la curva bajo condiciones iniciales, este proceso se siguió llevando a cabo el conteo celular explicado en el apartado 3.2.2.2.

Posteriormente el cultivo se sometió a estrés aplicando una mayor intensidad de luz (151-154 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ o 8400-8500 lux). De igual forma se monitoreó el comportamiento de la microalga mediante el conteo celular ⁵⁸, además se guardaron muestras diarias para realizar la extracción de astaxantina y evaluar su contenido durante 24 días que fue la totalidad del periodo de muestreo.

3.2.3.2 Curva de crecimiento usando 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

Empleando un cultivo con una concentración de 0,98 g/L se montaron los 3 sistemas C₁, C₂ y C₃, para iniciar la segunda curva bajo condición de estrés. En este caso se manejó una

intensidad de luz más alta y se evaluó el efecto que crea este factor tanto en la producción de biomasa, así como en la generación de astaxantina dentro de las células.

Se procedió de la misma manera que en el apartado 3.2.3.2; la curva se mantuvo con las mismas condiciones iniciales, la única variación en este caso fue que el proceso duró 23 días en total.

3.3. Extracción de astaxantina usando un disruptor celular mecánico

3.3.1. Tratamiento de las muestras

Se tomaron muestras diarias de 0,5 mL de cada una de las curvas donde se evaluó la intensidad de la luz, es decir a partir del día 9. Éstas fueron almacenadas en tubos eppendorff previamente pesados. Las muestras se almacenaron a -20 °C en un congelador para su mejor conservación. Las mismas se centrifugaron a 9000 rpm durante 6 min, empleando una centrífuga y a 4 °C⁴³, para después retirar el sobrenadante.

Las muestras libres de líquido se colocaron en un congelador de -80 °C por 2 horas, para su posterior liofilización empleando el liofilizador marca FreeZone® modelo 12 Plus. Concluido este paso, se pesaron para obtener el peso de la biomasa liofilizada.

3.3.1. Procedimiento de extracción

A cada una de las muestras que contenía la biomasa, se les agregó 0,5 mL de cloroformo y se colocaron en un disruptor celular mecánico marca Retsch MM 400 a 30 Hz durante 5 minutos. Pasado este tiempo se pusieron 45 segundos en un bloque frío para evitar la degradación térmica del compuesto. Para garantizar el efectivo rompimiento de todas las células, el proceso de disrupción se realizó una segunda vez, corroborando con la visualización en el microscopio.

Luego, cada muestra fue centrifugada a 9000 rpm, durante 6 minutos y a 4 °C⁴³; se recogió el sobrenadante en un vial. Al pellet obtenido se le realizó una segunda extracción con el fin de extraer parte de la astaxantina remanente. Se agregaron nuevamente 0,5 mL del disolvente, se llevó a un baño ultrasónico durante 10 minutos y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. El sobrenadante se depositó en el vial previamente rotulado para

cada muestra. Debido a la poca cantidad de muestra y que se trabajó a microescala, el disolvente se evaporó utilizando un Speed Vac, para concentrar cada muestra y reconstituir en una alícuota conocida para ser analizada en el HPLC marca Agilent Technologies, serie 1200.

A cada muestra se le agregó 0,5 mL de isopropanol, se filtró con filtros de 0,22 micras, se depositó en inserts de 200 μ L y se inyectó en el HPLC para ser analizada.

3.5. Cuantificación de astaxantina obtenida a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*

Se preparó una curva de calibración de astaxantina siguiendo las especificaciones que se encuentran en el Cuadro 3, a partir de una disolución madre con una concentración de 0,1003 mg/mL.

Cuadro 3. Preparación de los patrones de astaxantina para la curva de calibración.

Patrón (nivel)	Alícuota de Disolución Madre (μ L)	Concentración (mg/mL)	Disolvente de aforo	Balón (Volumen final)
Patrón 0	0	0	Isopropanol	1500 μ L
Patrón 1	100	0,00669		
Patrón 2	200	0,01337		
Patrón 3	300	0,02006		
Patrón 4	400	0,02675		

Se inyectó un volumen de 100 μ L tanto de las muestras obtenidas, así como los patrones de la curva de calibración. Estas fueron analizadas en el Centro de Innovaciones Biotecnológicas, empleando el gradiente de elución que se describe en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Gradiente de elución del método de HPLC utilizado.

Tiempo	A [%]	B [%]	Flujo [mL/min]
0.00	35.0	65.0	1.000
5.00	35.0	65.0	1.000
12.00	20.0	80.0	1.000
18.00	20.0	80.0	1.000
21.00	0.0	100.0	1.000
30.00	0.0	100.0	1.000
33.00	0.0	100.0	1.000

Parámetros utilizados:

Columna: C₁₈ de 5µm, longitudes: 150 x 4,6 mm.

Fase móvil: con gradiente de 33 min.

Donde A: Agua; B: Isopropanol (IPA).

Flujo: 1 mL/min

Tiempo de corrida: 33 min

Longitud de onda de interés: 471 nm

Volumen de inyección de muestra: 100 µL

3.6. Evaluación de la actividad antioxidante

Se prepararon los extractos para ser utilizados en la evaluación de la actividad antioxidante, pesando 10 mg de biomasa liofilizada, a la cual se le realizó el procedimiento de extracción del apartado 3.3.1. Estas muestras fueron reconstituidas en Etanol al 95% y se les realizaron las diluciones pertinentes para poder llevar a cabo los análisis mediante los dos métodos utilizados.

3.6.1. Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

Se siguió el protocolo establecido por el Laboratorio de Fitoquímica (LAFIT) de la Universidad Nacional, UNA; haciendo uso de un lector de microplacas de 96 pozos marca Synergy HT Multi-Mode marca Biotek ²³.

3.6.1.1. Preparación de estándares y curva de calibración

- Disolución de DPPH con concentración de 0,040 mg/mL

Se midió una masa de 0,0100 g de DPPH en balanza analítica marca Sartorius, modelo AX224 (capacidad máxima de 220 g, resolución 0,1 mg y linealidad de 0,2 mg)., en un balón de 250 mL cubierto con papel aluminio y se aforó con una mezcla de Metanol:Agua (80:20) ²³.

- Disolución madre de Trólox con concentración de 3500 µM

Se midió una masa de 22,58 mg de Trólox, se depositó en un balón de 25 mL y se aforó con la mezcla de Metanol:Agua, para obtener una concentración final de 3500 µM. A partir de esta disolución madre se preparó la curva de calibración con concentraciones desde los 70 µM hasta los 350 µM (Cuadro 5) ²³.

Cuadro 5. Preparación de los patrones para la curva de calibración del método DPPH ²³.

Patrón (nivel)	Alícuota de Disolución Madre (µL)	Concentración (µM)	Mezcla de aforo	Balón (Volumen final)
Patrón 1	200	70	Metanol:Agua (80:20)	10 mL
Patrón 2	429	150,15		
Patrón 3	629	220,15		
Patrón 4	829	290,15		
Patrón 5	1000	350		

3.6.1.2. Procedimiento para la determinación de actividad antioxidante

La determinación de la actividad antioxidante de los extractos se llevó a cabo en el lector de microplacas. A la placa de 96 pozos se le depositó por triplicado 30 µL de blanco (Metanol:Agua (80:20)), 30 µL de cada patrón y 30 µL del extracto a analizar. Una vez que se finalizó este paso, se procedió a agregar 270 µL de DPPH a cada uno de los pozos utilizados y se realizó la lectura correspondiente a una longitud de onda de 515 nm por 30 minutos ²³.

Los resultados se expresaron utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A-A_i}{A} \times 100$$

Donde:

A: Absorbancia del blanco

A_i: Absorbancia de la muestra.

Los datos finales se reportaron como μ moles equivalentes de Trólox.

3.6.2. Evaluación de la actividad antioxidante por el método ORAC.

De la misma manera, se siguió el protocolo establecido por el LAFIT. También se dispuso del lector de microplacas para realizar la lectura de absorbancia ²³.

3.6.2.1. Preparación de estándares y curva de calibración

- Buffer de fosfatos pH 7,5 con concentración de 75 mM

Se realizaron los cálculos para determinar la masa de cada una de las sales, utilizando la ecuación de Henderson-Hasselbalch. Se pesaron 2,0019 g de KH₂PO₄ y 3,9715 g de K₂HPO₄, para preparar 500 mL de buffer en un matraz volumétrico ²³.

- Disolución de AAPH con concentración de 153 mM

Debido a que esta disolución debía estar fresca, se preparó en el momento de utilizarse, midiendo una masa de 0,2070 g de AAPH, la misma se depositó en un balón de 5 mL y se aforó con el buffer de fosfatos ²³.

- Disolución madre de Fluoresceína de sodio con concentración de 4×10^{-2} mM

Se pesó una masa de 0,0015 g de fluoresceína de sodio, se llevó a un balón de 100 mL cubierto de papel aluminio y se aforó con buffer de fosfatos ²³.

A partir de esta disolución madre se preparó una disolución más diluida, tomando una alícuota de 10 μ L en un balón de 25 mL, aforando con buffer de fosfatos ²³.

- *Disolución madre de Trólox con concentración de 100 μ M*

Se midió una masa de 0,0013 g de Trólox, se colocó en un balón de 50 mL y se aforó con buffer de fosfatos. La misma se utilizó para preparar la curva de calibración y poder determinar la actividad antioxidante de los extractos de la microalga. Se procedió conforme al Cuadro 6 en viales de capacidad de 2 mL ²³.

Cuadro 6. Preparación de los patrones para la curva de calibración del método ORAC ²³.

Patrón (nivel)	Alícuota de Disolución Madre (μ L)	Alícuota de Buffer (μ L)	Concentración (μ M)	Mezcla de aforo
Patrón 0	0	1000	0	Buffer de fosfatos
Patrón 1	62,5	937,5	6,25	
Patrón 2	125	875	12,5	
Patrón 3	250	750	25	
Patrón 4	500	500	50	
Patrón 5	750	250	75	
Patrón 6	1000	0	100	

3.6.2.2. Procedimiento para la determinación de actividad antioxidante

Se procedió al llenado de la placa (Figura 15) con 300 μ L de agua destilada para que se generara una saturación de la atmósfera en el lector y para que sirviera de esta manera como aislante del entorno ⁶¹.

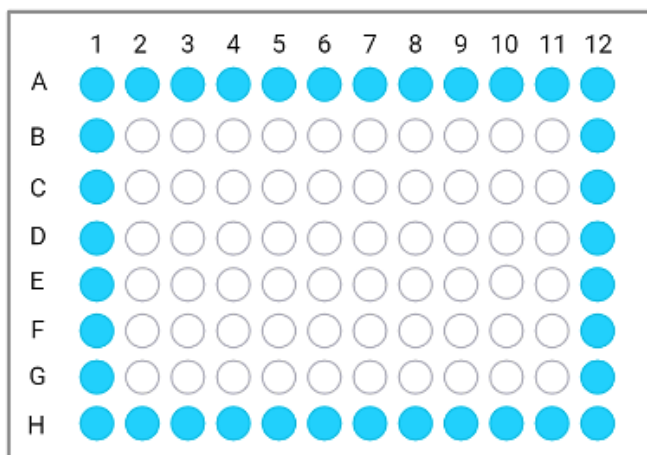


Figura 15. Representación del llenado de la placa de 96 pozos para determinar la actividad antioxidante por el método ORAC (Adaptada de ⁶¹).

Posteriormente se procedió al montaje de la curva de calibración donde se agregaron 20 μL de cada patrón, así como de blanco reactivo (buffer de fosfatos). A los pozos restantes y disponibles se les agregó de la misma manera 20 μL del extracto a analizar. A cada pozo con muestra, patrón y blanco se le añadió 130 μL de la disolución diluida de fluoresceína; una vez montada la placa se procedió a incubar en el lector de placas a 37 °C por 20 minutos. Pasado este tiempo, se le adicionó a cada pozo experimental 30 μL de la disolución de AAPH y se realizó la lectura de absorbancia cada minuto hasta que se obtuvieron 60 lecturas. Se utilizó un filtro de excitación de 485 nm y uno de emisión de 528 nm, ya que este es un método fluorescente ^{23,61}.

3.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) de un solo factor vía Minitab con un nivel de significancia de $\alpha= 005$ junto con la prueba de Shapiro para determinar la normalidad de los datos y comprobar la homogeneidad de varianzas. Además, se realizó la prueba de TuckeyHSD para determinar si existen diferencias significativas entre las curvas con diferentes intensidades de luz.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Curvas de crecimiento de la microalga *H. pluvialis* bajo condiciones iniciales en el laboratorio.

Dado a que es indispensable la realización de varios ensayos para hacer el correcto seguimiento del crecimiento celular de un microorganismo, se procedió a examinar el comportamiento de la microalga en cuestión, utilizando el método de peso seco expresado en g/L, así como el método de conteo celular (cel/mL); a partir de los datos recopilados (Anexo 3) durante la duración del muestreo.

Ambas gráficas de dispersión mostraron un comportamiento relativamente similar a lo establecido teóricamente, con referencia a las etapas o fases de una curva de crecimiento celular. Tanto en la curva basada en peso seco (Figura 16) así como en la basada en conteo celular (Figura 17), se observó una tendencia lineal al crecimiento durante todo el proceso de cultivo de la *H.pluvialis*.

A pesar de que las fases o etapas de una curva de crecimiento son bastante difíciles de determinar en la práctica ³³, se logró evidenciar específicamente una fase de adaptación la cual se alcanzó a los pocos días de iniciado el muestreo. En otras palabras, las células suspendidas de la microalga *H.pluvialis* tardaron un rango entre 1-2 días respectivamente (Figuras 16 y 17), para adaptarse al cambio de la concentración de nutrientes ³⁵ que poseía el medio de cultivo (Anexo 1) que fue utilizado en esta investigación.

El comportamiento inicial de las curvas está directamente relacionado con las condiciones en que se encontraban las células del inóculo que se empleó, así como al cambio de pH, iluminación y temperatura. Es por ello que no se presentó mayor problema en el monitoreo del crecimiento celular, ya que el inóculo mantuvo un ambiente similar al que se utilizó en cada experimento ³³. Esto se demostró tras el poco tiempo de duración de la fase de adaptación del nuevo cultivo, la cual fue relativamente corta como se observan en las figuras 16 y 17.

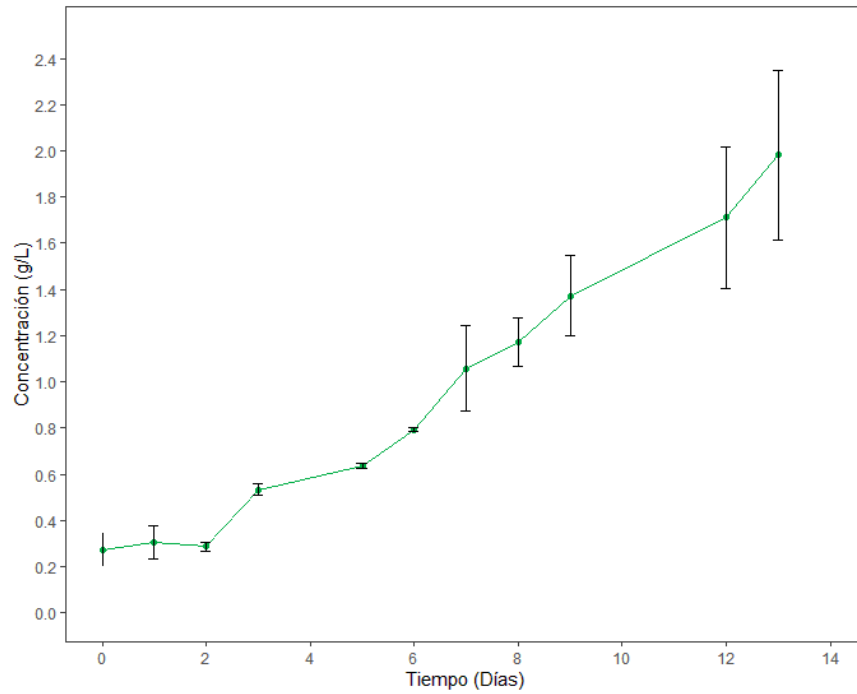


Figura 16. Curva de crecimiento de *H.pluvialis* basada en peso seco expresada en g/L en función del tiempo (días) a una intensidad lumínica de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.

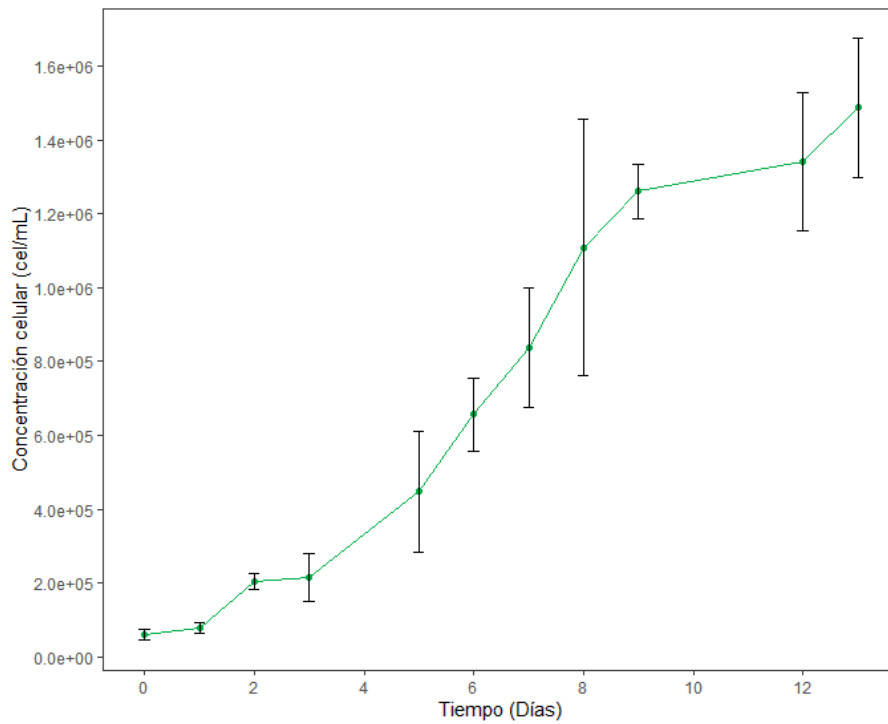


Figura 17. Curva de crecimiento de *H.pluvialis* basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (días) a una intensidad lumínica de $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.

Por otro lado, se alcanzó a observar la fase exponencial en la curva de conteo celular a partir del día 2 y hasta el día 9. En esta fase se presentó el punto máximo de crecimiento de la microalga en términos de concentración celular obteniendo $1,26 \times 10^6 \pm 7,21 \times 10^4$ cel/mL, correspondiente a la finalización de dicha etapa. Durante este proceso la microalga *H.pluvialis* mantuvo una división celular acelerada y constante; ocasionando de esta manera, el aumento de su población ^{34,35}. A pesar de que se observó un incremento bastante rápido se determinó de manera general, que no se alcanzaron valores tan elevados entre sí, por el contrario, los valores representados permanecieron relativamente constantes ³³.

Con respecto a la curva de peso seco, la fase exponencial fue difícil de determinar, sin embargo, también se pudo visualizar un aceleramiento significativo de la concentración, la cual pasó de $0,29 \pm 0,02$ g/L hasta $1,98 \pm 0,37$ g/L, es decir, aproximadamente cinco veces más que desde el inicio del ensayo. Como se pudo comprobar, la información obtenida en los métodos de seguimiento de crecimiento celular, no fueron constantes entre sí; debido a que coexistieron diversos factores que influyeron en la obtención de los resultados, entre ellos: el estado fisiológico de cada célula, la fase de crecimiento, así como las condiciones ambientales a las cuales estuvo expuesto el cultivo en observación. Esto explica el por qué es tan indispensable la realización de estos métodos de manera simultánea, para la obtención de datos más confiables y una mejor representación de las fases de crecimiento celular ³³.

Uno de los factores más sobresalientes fue las condiciones ambientales, ya que estas cambian con la edad del cultivo, además afectó directamente la velocidad de crecimiento de la microalga, lo cual a su vez permitió reconocer las etapas de cada curva en función tanto de la concentración celular así como de la biomasa obtenida ³³.

Las curvas bajo condiciones controladas en el laboratorio fueron monitoreadas durante un total de 13 días. El tiempo de cada experimento no se prolongó durante un mayor tiempo, debido principalmente al volumen. Con el fin de reducir costos y determinar su viabilidad con miras al escalamiento futuro, cada cultivo inició con un volumen total de 800 mL. Debido a que diariamente se tomaban 16 mL aproximadamente, al final del periodo de monitorización ya no era recomendable seguir con la toma de muestras, especialmente por la deficiencia de nutrientes ³⁴, así como la edad del cultivo ³³. Esto en correspondencia a

que los datos recopilados no serían viables; y además de que se determinó que el tiempo establecido para cosechar a la microalga, fue alrededor de 9-10 días.

Estudios recientes demostraron que los factores más significativos que afectan el comportamiento de las células fotoautotróficas, específicamente de la *H.pluvialis* son la intensidad de luz así como el nitrógeno disponible en el medio de cultivo ⁴⁶. El nitrógeno es uno de los principales nutrientes que esta microalga utiliza para su crecimiento ⁴⁶ y el medio BG-11 (Anexo 1) que se utilizó en este estudio, se caracterizó por poseer una gran cantidad de nitrato de sodio (NaNO₃) como fuente de este elemento, específicamente de 1,5 g por cada litro de medio utilizado ⁵⁷.

En comparación con otro estudio, Hernández ⁶²; realizó una publicación utilizando una cepa de la microalga *H.pluvialis* y determinando su comportamiento mediante el uso de dos medios de cultivo diferentes denominados: medio OHM (Medio Óptimo de *Haematococcus*, por sus siglas en inglés) y Kobayashi. En dicho caso se evaluó el crecimiento de esta microalga bajo diferentes condiciones, donde se determinó que la densidad celular máxima obtenida fue de 1,23x10⁶ cel/mL y 1,00x10⁵ cel/mL, en cada uno de los medios respectivos; correspondientes al día 14 de iniciados los procesos de monitoreo ⁶².

Cabe resaltar que las condiciones empleadas en el experimento de Hernández fueron diferentes en comparación al ensayo actualmente realizado, sin embargo; es importante destacar que utilizando medio BG-11, la concentración al día 9 fue de 1,26 x10⁶ cel/mL. Como se puede observar, se obtuvo relativamente la misma concentración que la reportada por Hernández usando el medio OHM, no obstante, con una diferencia de 5 días, acortando de esta manera el proceso. Con estos resultados se mostró una clara reducción en los tiempos de espera o mejor dicho, en los periodos de cosecha de la microalga *H.pluvialis*, lo que implicó también en una disminución de los recursos utilizados, dando en este caso una mayor producción de biomasa, expresada como concentración celular por unidad de volumen.

Es importante mencionar que a partir del día 9 la concentración celular presentó muy pocos cambios (Cuadro 14, Anexo 3), básicamente dando indicio a la fase estacionaria, donde la

densidad celular permaneció invariable (Figura 17) debido a que se igualaron el crecimiento y la mortalidad de las células ³⁴. Por lo tanto, se consideró este dato como el valor máximo de crecimiento celular, además de que los siguientes puntos mostraron una desviación estándar bastante amplia, manifestando así la poca precisión de los datos finales.

El medio de cultivo OHM usado en el estudio de Hernández, se caracterizó también por poseer una concentración adecuada de KNO₃ como fuente de nitrógeno, específicamente de 0,41 g por litro de medio utilizado ⁶³. Lo cual reafirma, la necesidad de este elemento químico en el desarrollo de las células de la microalga *H.pluvialis*; al mismo tiempo, se fortaleció con vitaminas como biotina, B₁₂ y tiamina, que lo hacen un medio óptimo para el crecimiento de este microorganismo ⁶³. Los medios OHM y BG-11 comparten similitudes en su composición química y por esta razón se da una convergencia en la concentración celular reportada, dando poca variabilidad entre los resultados conseguidos. Mientras que la concentración obtenida en el estudio de Hernández empleando el medio Kobayashi, fue menor, ya que el mismo poseía una baja concentración de nitrato ⁶².

Con respecto a la concentración de nitrógeno, Salazar *et al*, realizaron un estudio variando la concentración de nitrato y determinaron que el valor mínimo para un óptimo crecimiento de la microalga fue alrededor de 1,25 g por litro de medio, ya que este es uno de los macronutrientes esenciales en la división celular de dicho microorganismo, así como en la acumulación de pigmentos con características de interés científico ⁶⁴. Consecuentemente, en este ensayo se presentó una mayor concentración celular debido a que la cantidad de nitrato utilizada en el medio BG-11 excede lo establecido en dicho estudio previo, lo cual fue beneficioso para la microalga y ayudó a la capacidad de obtención de una cantidad de células en un menor tiempo.

El crecimiento celular depende estrechamente de las condiciones del medio de cultivo, las cuales deben ser óptimas o apropiadas para alcanzar la máxima productividad celular ⁶⁵. Li *et al*, hacen hincapié en que el pH establecido para maximizar el incremento celular es de un pH cercano a la neutralidad, específicamente 7,5 ⁶⁶. El medio utilizado en esta investigación cumplió con dicho parámetro, ya que el pH se ajustó de tal manera hasta obtener un valor de 7,4 ⁵⁷. Además de que se suministró aire continuamente para asegurar

la agitación constante del cultivo celular y se inyectó dióxido de carbono con el fin de mantener el pH invariable ⁶⁶.

Es importante recordar que en el proceso de fotosíntesis se da la liberación de protones al medio, ocasionando de esta manera una disminución del pH del cultivo celular ⁶². Sin embargo, esta variable no fue monitoreada durante todo el desarrollo de esta investigación ya que el objetivo de este estudio fue evaluar uno de los diversos factores de estrés para la producción de astaxantina y su influencia en la producción de dicho pigmento. Por otro lado, *García et al*, indicaron que es recomendable mantener los cultivos a una temperatura entre 25-28 °C, es decir, aproximadamente a temperatura ambiente, así como una intensidad lumínica baja correspondiente a un rango de 50-150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, parámetros que se siguieron en este estudio para mantener un adecuado crecimiento de las células en fase verde. Estas condiciones propuestas en el estudio citado mostraron una población de células en un rango de $1,1 \times 10^6$ – $3,8 \times 10^6$ cel/mL ⁶⁷, valores muy similares a los reportados en la investigación actual.

Estudios anteriores han demostrado que cada especie de microalga, presenta una preferencia por algún medio de cultivo en específico y debido a esto hay una relación directamente proporcional con la tasa de crecimiento y el contenido bioquímico de cada célula ⁵⁹. Por eso se tomaron en cuenta los diversos factores para conocer la cinética de crecimiento bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas de la Universidad Nacional de Costa Rica, LABMA.

Además de determinar las fases de las curvas de crecimiento, también se observaron cambios fisiológicos y morfológicos en las células de la microalga *H.pluvialis* bajo las condiciones iniciales. Durante los primeros días se visualizaron células vegetativas biflageladas de color verde, las cuales estuvieron directamente relacionadas con la producción de la biomasa en el medio de cultivo ⁶². Las mismas presentaron un tamaño inferior, sin embargo, conforme pasaron los días de muestreo, dichas células incrementaron sus dimensiones como se observa en la figura 18.

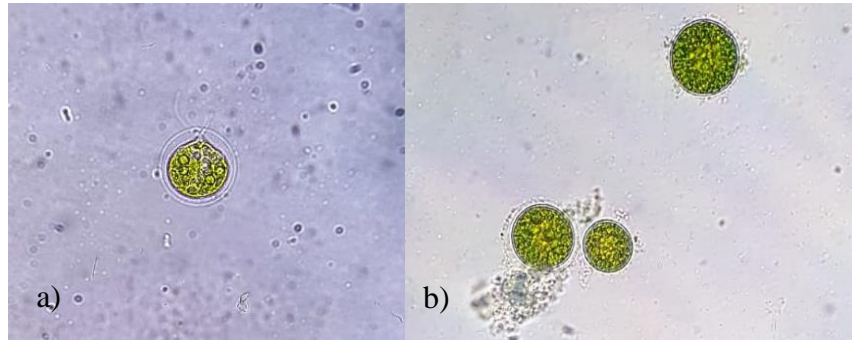


Figura 18. Cambios morfológicos de la microalga *H.pluvialis* a) día 0 de iniciado el proceso de cultivo y b) correspondiente al día final (día 13); bajo condiciones iniciales en el laboratorio, observado en el microscopio a 40X (Imágenes propias tomadas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas; LABMA,UNA)

Asimismo, se visualizaron células con forma de pera (Figura 18a), conocidas como zoosporas, las cuales mostraron flagelos en su estructura, estas fueron las responsables de llevar a cabo la división celular, mediante el proceso de mitosis. Las mismas detienen su ciclo celular una vez completado 5 veces el proceso correspondiente, se dice que cada célula madre es capaz de generar 32 células hijas ^{30,62}. Además, en la etapa de finalización del experimento se observó cómo estas cambiaron su estructura hasta la formación de células en forma de esfera y sin flagelos, con una pared celular mucho más rígida (Figura 18b). Estos cambios se presentaron debido principalmente a la escasez de nutrientes en el medio de cultivo, provocando de esta manera una mayor resistencia a los cambios agresivos de las condiciones de crecimiento ideales o iniciales ⁶².

Todos los parámetros utilizados durante este experimento lograron maximizar la proliferación de las células verdes, durante la primera etapa del ciclo celular de la microalga, denominada fase verde. Completado este primer paso experimental, se establecieron las condiciones iniciales de crecimiento de la microalga, para posteriormente inducir a las células a la fase roja, hasta obtener la generación y acumulación de astaxantina bajo una intensa iluminación ³⁰.

4.2. Curva de crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando variaciones de la intensidad de luz.

Gracias a la determinación de la máxima concentración celular obtenida en la curva de crecimiento del apartado anterior, se determinó que la *H.pluvialis* logró este cambio durante los 9 días de iniciado el cultivo de la misma. Por lo que las curvas de crecimiento utilizando variaciones de luz para la producción de astaxantina, mantuvieron las mismas condiciones iniciales (Anexo 2) hasta lograr el máximo crecimiento. Sin embargo, cumplido dicho lapso, los cultivos se sometieron a las variaciones de intensidad lumínica de 150 y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$; con el fin de determinar el comportamiento de la densidad celular, así como la generación o producción del pigmento de interés, la astaxantina.

Se establecieron estos dos valores, con el fin de determinar el comportamiento de la microalga utilizando una doble intensidad de luz y, además visualizar la conducta de esta, al emplear un valor mucho más intenso, tomando en cuenta la capacidad de las luces LED disponibles en el laboratorio donde se llevó a cabo el experimento.

En el cuadro 7 se pueden observar los resultados obtenidos, relacionados con la tasa de crecimiento y tiempo de generación ^{59,60}.

Cuadro 7. Tasa de crecimiento y tiempo de generación correspondiente a la fase exponencial de la *H.pluvialis* en condiciones iniciales controladas en el laboratorio, a 150 y 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Cultivo	Tiempo inicial y tiempo final (d)	μ (d^{-1})	Tg (d)
Condiciones iniciales	2-9	0,3	2,7
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	2-9	0,2	3,9
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	2-10	0,2	3,9

* d: días

Las curvas de crecimiento fueron muy similares, presentaron una fase exponencial con un periodo de duración de 7-8 días como se observa en el cuadro anterior. Por otro lado, se realizó un análisis estadístico, específicamente un ANOVA de un solo factor para determinar diferencias significativas entre las curvas, donde se concluyó que no se

muestran discrepancias en las condiciones utilizadas en las tres curvas en general (Anexo 6). Es decir, los resultados obtenidos, expresados como densidad celular (cel/mL) se mantuvieron similares durante la fase exponencial de cada curva, conservando condiciones experimentales equivalentes. Sin embargo, es evidente que existieron diferencias entre los días iniciales y finales correspondientes a la fase exponencial, dado al aumento significativo de la concentración celular ³⁴.

Se determinó una tasa de crecimiento que osciló entre 0,2-0,3 por día, la cual estableció la velocidad de crecimiento por unidad de biomasa producida y además del tiempo de generación o duplicación de la población que varió entre 3-4 días. Estos datos fueron importantes para evaluar el comportamiento de la microalga *H.pluvialis* ⁶⁸. Como se mencionó anteriormente, no se mostraron diferencias entre las tres curvas, cabe resaltar que no hubo variaciones en las condiciones experimentales iniciales. Por el contrario, tanto la intensidad lumínica, pH, así como la concentración de nitrato y fosfato del medio de cultivo fueron constantes, es por esto que la tasa de crecimiento no mostró diferenciaciones en los experimentos realizados ⁵⁹.

Como se mencionó anteriormente, se analizó el efecto que generaron las variaciones de las intensidades lumínicas tanto en la producción de biomasa, como en la acumulación de astaxantina en las células de la microalga. Se observó (Figura 19) que al exponer a las células a una intensidad lumínica correspondiente a 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, la concentración celular mostró una tendencia lineal al aumento. A partir del primer día de dicha exposición (concretamente el día 9), la concentración reportada fue de $7,94 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$ cel/mL, mientras que al finalizar dicho experimento se obtuvo un valor de $1,46 \times 10^6 \pm 3,16 \times 10^5$ cel/mL, correspondiente al día 24, un incremento de 666 000 células por unidad de volumen.

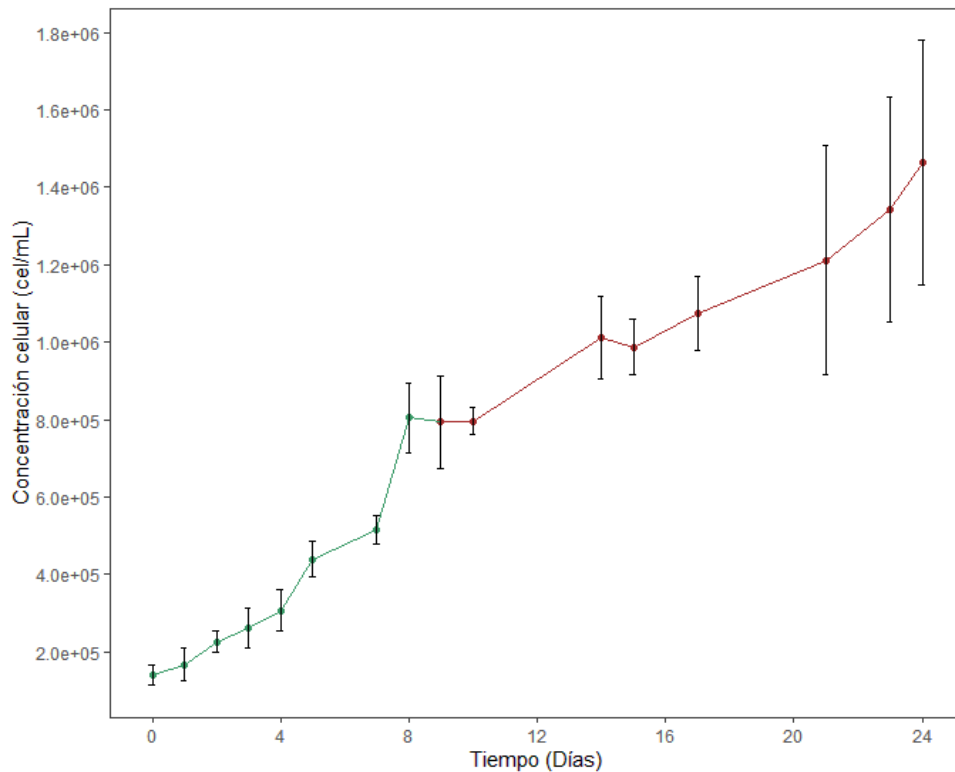


Figura 19. Curva de crecimiento *H. pluvialis* basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (horas) a una intensidad lumínica de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.

Por otro lado, a la curva a la cual se le aplicó una intensidad de luz mayor, específicamente de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, también mostró una tendencia al aumento; hasta llegar a un punto máximo alrededor de los 13-15 días correspondientes a $1,21 \times 10^6 \pm 6,51 \times 10^4$ y $1,25 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^5$ cel/mL, respectivamente. Posteriormente se manifestó un decaimiento de la concentración celular, como consecuencia de la muerte de varias células^{34,35}, finalizando el proceso como tal (Figura 20). La intensidad de luz, generó un efecto positivo en la producción de biomasa, este crecimiento se observó de manera casi lineal a lo largo del periodo experimental⁶⁹, exceptuando la curva donde la células estuvieron expuestas a una mayor intensidad lumínica.

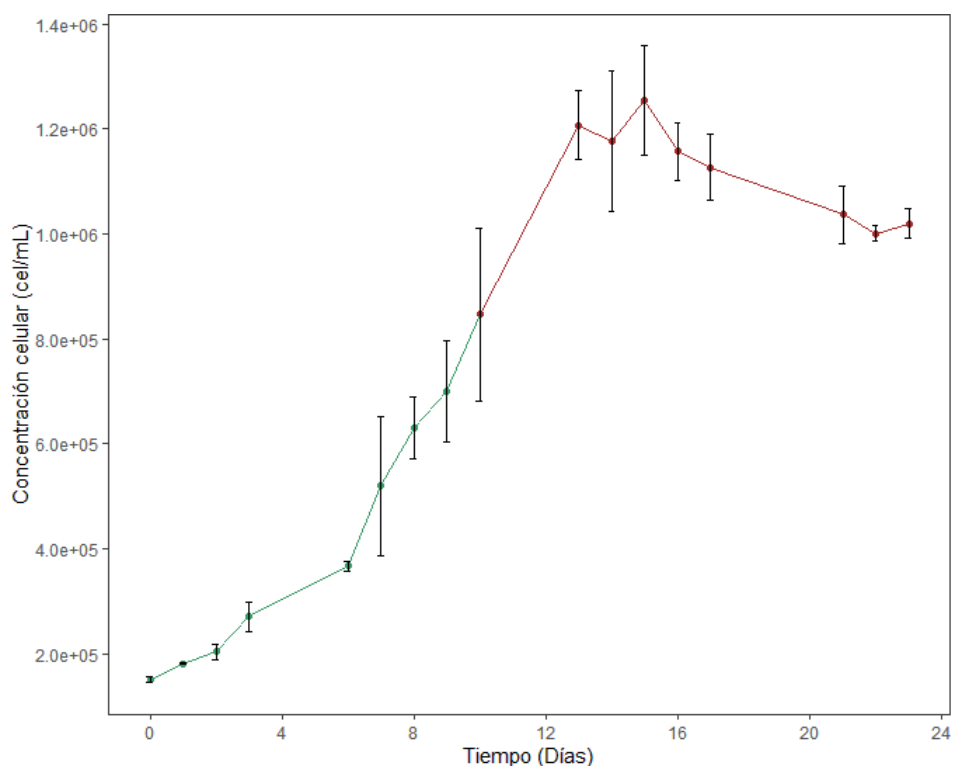


Figura 20. Curva de crecimiento *H.pluvialis* basada en conteo celular expresada en cel/mL en función del tiempo (horas) a una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. La desviación estándar está representada por las barras de error.

La energía necesaria para llevar a cabo el proceso de fotosíntesis se manifiesta en forma de luz. Se le considera a la longitud de onda de la luz visible como la radiación fotosintética activa (PAR por sus siglas en inglés), en otras palabras, es aquella luz que las plantas o algunos microorganismos fotosintéticos utilizan para llevar a cabo dicho proceso. Actualmente se emplea la luz artificial como una fuente de fotones, la cual es la energía que incide de manera apta para que se efectúen las reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis ⁷⁰. Debido a esto, se empleó la luz artificial haciendo uso de lámparas fluorescentes de 18 W, disponibles en el área de trabajo, con el fin de garantizar la energía necesaria para lograr la síntesis de astaxantina.

Comparando las dos curvas con valores de intensidad lumínica diferentes, se comprobó que la luz es uno de los factores indispensables en el cultivo de la microalga, ya que esta afecta al crecimiento, así como al proceso de síntesis o producción de metabolitos secundarios. Estudios anteriores determinaron que una intensidad de luz muy fuerte puede provocar una fotoinhibición en las células de la microalga, limitando el crecimiento de esta. Por lo que es

fundamental establecer los parámetros adecuados de exposición o duración, cantidad y calidad de esta ⁶².

Como se pudo observar en la figura 20, la generación de biomasa expresada como densidad celular (cel/mL) cesó al día 15, donde hubo un decaimiento hasta el día 23. Kiperstok *et al*, hacen énfasis en que la exposición de las células a radiaciones muy altas provoca una disminución de la concentración, expresada como cel/mL, generando de esta manera un estancamiento gradual de la tasa de crecimiento ⁶⁹. Fue evidente que empleando una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, la generación de células de la microalga disminuyó, concluyendo que es una condición experimental deficiente para la generación de biomasa, ya que la alta radiación incide en la muerte de las células.

El análisis microscópico manifestó cambios en la morfología celular de la microalga *H.pluvialis* durante los periodos de una mayor inducción de radiación, en comparación a las condiciones iniciales propuestas. Las células verdes pasaron a tener una coloración rojiza, evidenciando de esta manera la acumulación de astaxantina ⁷¹ (Figura 21). Estos cambios fueron similares tanto en la curva de 150, como en la de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, por lo que posteriormente se procedió a analizar el contenido de astaxantina en cada una de las muestras tomadas a diario para identificar variaciones con respecto a la producción de este pigmento.

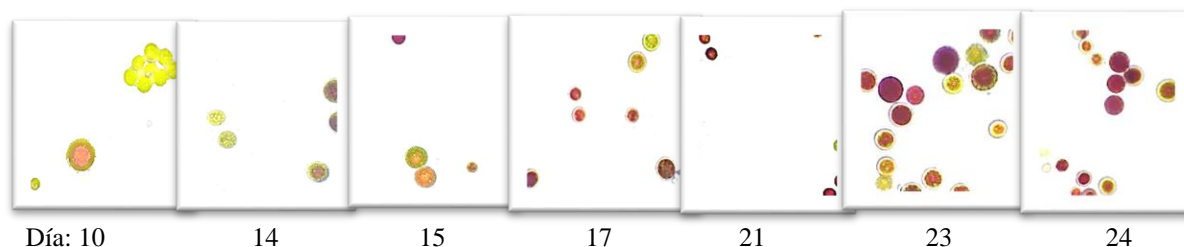


Figura 21. Cambios morfológicos de los muestreos diarios durante la exposición de luz de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ al cultivo de la microalga *H.pluvialis*.

Saha *et al*, establecieron que para inducir la producción de astaxantina se deben utilizar células verdes senescentes, es decir, que estén en una etapa madura, específicamente aquellas células verdes en forma de pera ⁷². Por lo que las condiciones iniciales de las dos

curvas correspondientes a la investigación actual se mantuvieron hasta la finalización de la etapa del ciclo celular conocida como la fase verde de la microalga *H.pluvialis*, o mejor dicho hasta la aparición de las células llamadas palmelas ³⁰. En este estudio en particular realizado por Saha *et al*, las células verdes inmóviles se observaron durante un periodo de 10 días antes de aplicar los factores de estrés empleados por estos investigadores ⁷². Dato que concuerda con lo realizado durante este experimento, donde también se observaron células en la etapa verde en un lapso de 9-10 días como se corroboró en la figura 21, en la cual apenas se empezaron a manifestar los cambios de las fases verde a roja.

A medida que se aumentó la intensidad de luz, lo hizo también la producción de astaxantina, ya que las células comenzaron a perder la movilidad debido a la carencia de los flagelos, formando de esta manera quistes, conocidas como aplanosporas, que presentan una pared celular mucho más gruesa ⁷¹. La aparición de la pigmentación roja aumentó ocupando casi todo el volumen de la célula al finalizar el proceso ⁷¹, como se pudo observar en la figura anterior. Además, la deficiencia de nutrientes en esta etapa ayudó a la formación de los quistes dada la exposición de las células a los cambios en las concentraciones de los sustratos ^{34,35}.

Para determinar el contenido de astaxantina, se procedió con la realización de una curva de calibración, en la cual se correlacionó el área bajo la curva obtenida de los cromatogramas generados en el equipo de HPLC (Anexo 7) con las concentraciones utilizadas, empleando un patrón adecuado (Figura 25). Posteriormente se analizó el contenido diario en las muestras de los extractos obtenidos durante el periodo experimental para establecer la posible variabilidad al utilizar las dos intensidades de luz propuestas.

En las dos curvas donde se aplicaron dichas intensidades de luz, se observó un aumento de la concentración de astaxantina reportada como $\mu\text{g/mL}$. Cuanto mayor la intensidad de luz, mayor el contenido de este pigmento ⁷¹, como se puede observar en la figura 22. En otras palabras, un aumento significativo de la intensidad o radiación empleada generó una mayor concentración de astaxantina en un menor tiempo, debido a la rápida aparición de la pigmentación roja en las células ⁷¹. Además, se evidenció la disminución del contenido de clorofila en las aplanosporas ³⁰, como una respuesta a la intensidad de la luz, dando paso a

la fase roja característica de esta microalga ⁷², ya que a nivel macroscópico desapareció el color verde particular de este pigmento.

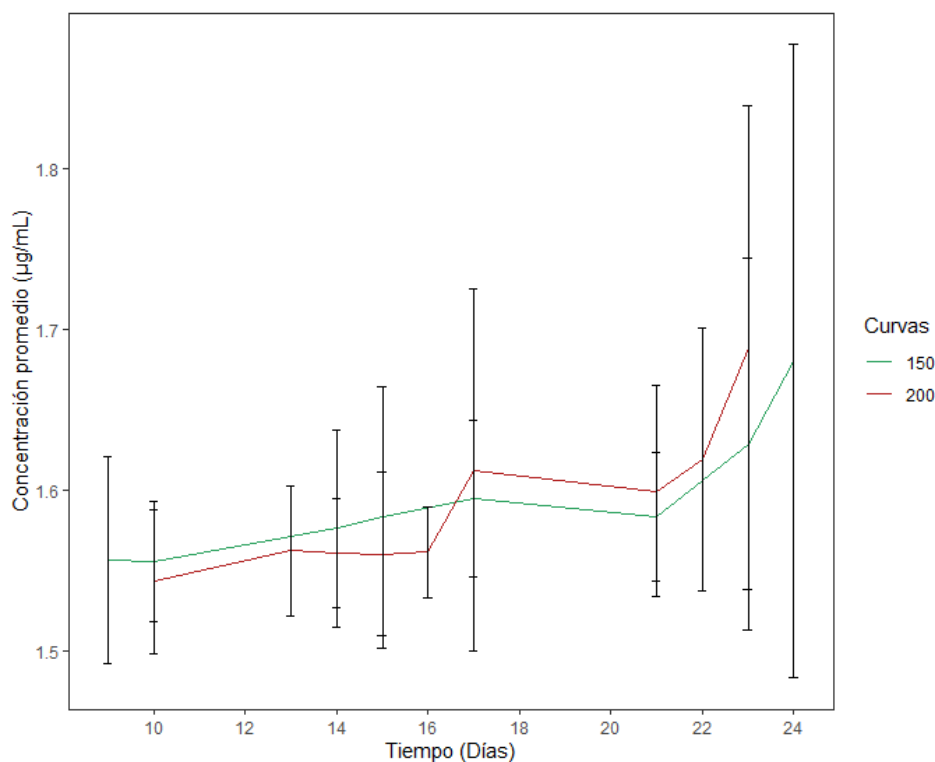


Figura 22. Representación gráfica de la concentración promedio expresada en $\mu\text{g/mL}$ de astaxantina en función del tiempo. La desviación estándar está representada por las barras de error.

La curva correspondiente a $200 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ mostró un ligero aumento de la concentración de astaxantina desde el día 17 hasta el día 23, se obtuvieron valores desde $1,61 \pm 0,11$ a $1,69 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Por otro lado, la curva de $150 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ tuvo un comportamiento similar, particularmente en el día 23-24, donde se reportaron los siguientes valores de concentración $1,63 \pm 0,12$ - $1,68 \pm 0,20 \mu\text{g/mL}$. En la figura 22 se pudo observar que, en ambos casos al aplicar el factor de estrés, se incrementó de manera leve el contenido del pigmento, donde inicialmente la tasa de producción de astaxantina fue baja, finalizando con una mayor cantidad de este compuesto químico.

Li *et al*, realizaron un estudio donde analizaron el efecto generado al aplicar diferentes intensidades de luz, específicamente de 30, 80 y $150 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$, en células de la microalga *H.pluvialis* cultivadas utilizando un medio conocido como BBM. Determinaron de la misma forma, que cuanto mayor era la intensidad de luz aplicada, existía una mayor

producción de astaxantina, por lo que correlacionaron este factor de estrés como una variable directamente proporcional con la generación de dicho pigmento ⁷¹.

El proceso relacionado con la generación y acumulación de astaxantina, trae consigo una gran cantidad de cambios estructurales, comprendiendo también la formación de cuerpos lipídicos. Aquellas células que sintetizan este compuesto lo hacen como una respuesta a las condiciones adversas del medio de cultivo, de manera general mediante condiciones denominadas factores de estrés, es decir, a la intensidad lumínica en este caso en particular. Además, aproximadamente el 90% de la astaxantina producida se asocia con uno o dos ácidos grasos presentes en el núcleo de las células, principalmente el ácido oleico, dando paso a la formación de astaxantina mono o diesterificada ³⁰. La concentración obtenida del pigmento a lo largo del desarrollo del monitoreo fue bastante baja e invariable, ya que la astaxantina libre ocupa solamente un 10% de la total producida.

La síntesis de astaxantina se desarrolla mediante dos fases que provienen de una fuente diferente de β -caroteno. Generalmente alrededor de las primeras 6 horas de intensa radiación, la microalga utiliza el contenido de β -caroteno previamente sintetizado, como el precursor para la generación de astaxantina, dando paso a una disminución de este otro carotenoide. En la fase II, la cantidad de β -caroteno aumenta ligeramente y se da la presencia en su mayoría, de los ésteres de astaxantina ³⁰. Razón por la cual, no se observó una gran cantidad del contenido de astaxantina en su forma libre, debido a que predominan los monoésteres y diésteres. Sin embargo, el objetivo de esta investigación era evaluar dicha producción en los extractos crudos obtenidos.

Además de determinar el contenido del carotenoide de interés, se realizaron las gráficas respectivas, para relacionar el efecto del factor de estrés con la producción del pigmento, así como la de biomasa. En la figura 23 se puede visualizar lo generado al utilizar la radiación de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ y en la figura 24, la tendencia determinada al usar la mayor intensidad de luz.

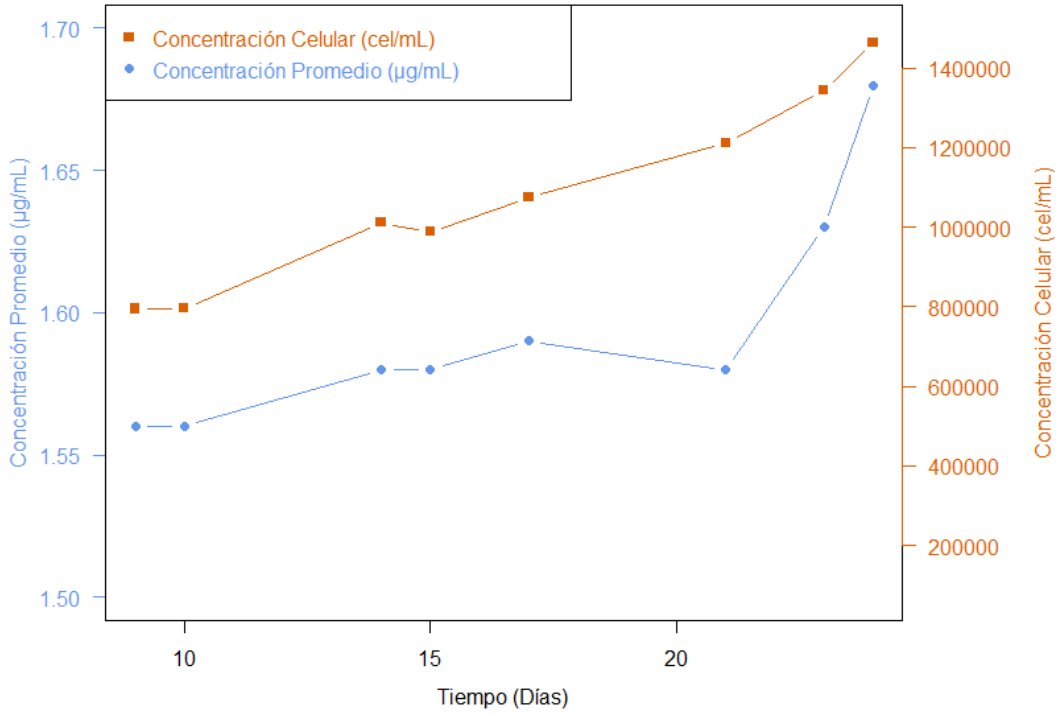


Figura 23. Comparación gráfica de la concentración celular y el contenido de astaxantina a una intensidad de luz de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

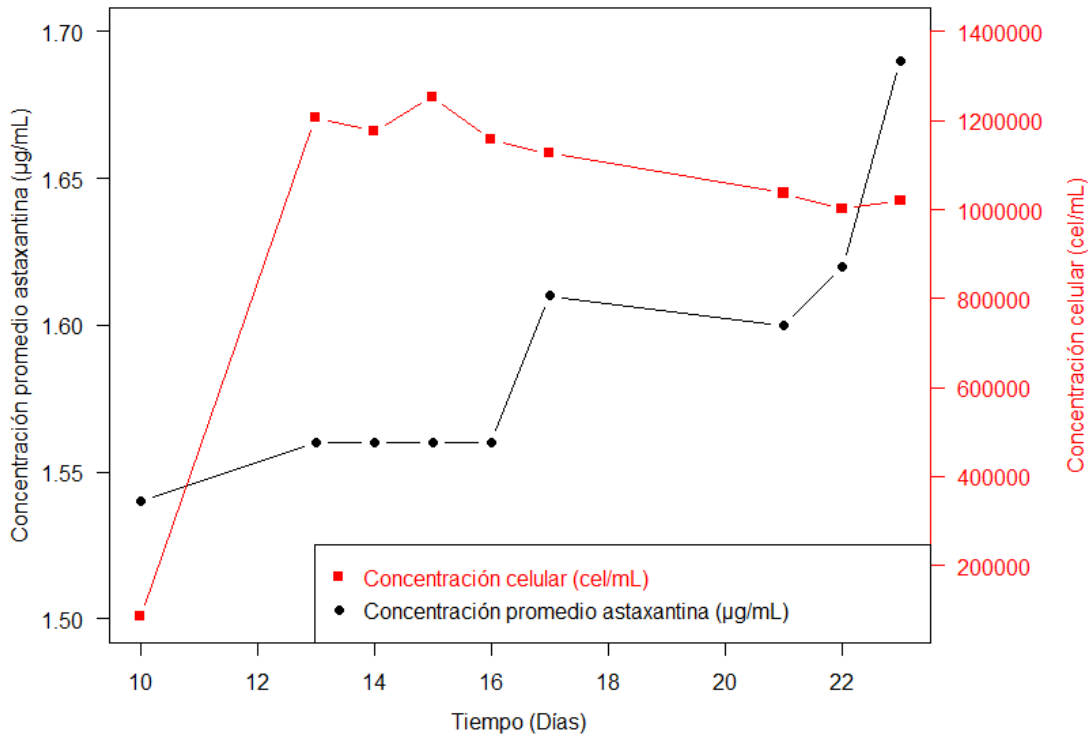


Figura 24. Comparación gráfica de la concentración celular y el contenido de astaxantina a una intensidad de luz de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

La figura 23, siguió la tendencia que estudios anteriores reportan, de que la radiación artificial es un factor determinante tanto para la generación de biomasa, así como la síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo, así como se da el aumento de la concentración celular, también aumenta la atenuación de la luz en el cultivo microalgal, por lo que la disponibilidad de la luz ya no es tan eficiente para cada una de las células, lo cual crea que el crecimiento celular tienda a disminuir; convirtiéndose la luz en un factor de estrés y no en una condición vital del desarrollo celular, generando de esta manera el aumento significativo del contenido de astaxantina y por ende limitando el crecimiento celular ⁷³.

Un aumento tan elevado de la intensidad lumínica provocó un gran impacto de estrés en el cultivo analizado, generando de esta manera la pérdida de células en los últimos días de monitorización ⁷⁴ (Figura 24). Oncel *et al*, concuerdan en que es preferible aumentar la intensidad de luz gradualmente, debido a que cuando se realizan cambios tan abruptos se inhibe el crecimiento celular y se reduce la respiración aerobia en las células ⁷⁴.

Utilizar un sistema de cultivo adecuado ocasiona que se dé una producción de biomasa y astaxantina apropiada, además dicha producción también depende de la estación y clima local donde se desarrolle el experimento científico ⁷⁵. Se emplearon sistemas de cultivo de interiores a pequeña escala, con luz artificial para evaluar la productividad y obtención del pigmento fotosintético, sin embargo, para un mayor control de todas las variables, es indispensable que se utilicen cultivos en sistemas cerrados para tener un mayor control de contaminación, agitación, temperatura, intensidad de luz; con el fin de garantizar un entorno de crecimiento óptimo de la microalga ⁷⁵.

4.3. Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de la microalga *H.pluvialis*.

Con los datos proporcionados por las curvas anteriores, y tomando en cuenta que la concentración de astaxantina fue ligeramente mayor aplicando condiciones de luz correspondientes a 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, se procedió con la determinación de la actividad antioxidante del extracto obtenido al finalizar el proceso de producción del carotenoide. Este análisis para comprobar o determinar la capacidad antioxidante de los extractos de astaxantina, fue realizado a los tres sistemas de cultivo denominados como C₁, C₂ y C₃.

Es importante recalcar que existe una variedad de métodos para establecer la capacidad o actividad antioxidante de un compuesto químico, cada uno con sus ventajas y desventajas. En esta investigación se realizaron dos, principalmente porque la determinación de la actividad antioxidante proporcionada por carotenoides, aplicando el método DPPH suele ser confusa, ya que estos compuestos orgánicos causan interferencias a la hora de expresar los resultados ⁵⁴.

En cada uno de los ensayos para determinar la actividad antioxidante de la astaxantina se emplearon las curvas de calibración correspondientes, utilizando un patrón adecuado con el fin de realizar la comparación. Con respecto al ensayo de actividad antioxidante por el método DPPH, los resultados no fueron concluyentes (Cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados de la actividad antioxidante empleando los métodos DPPH y ORAC.

Muestra	DPPH	ORAC $\mu\text{mol ET/g MS}$
C ₁	NC	95,8 \pm 1,9
C ₂	NC	94,1 \pm 1,7
C ₃	NC	71,9 \pm 0,3

* NC: No concluyente
MS: muestra

Para medir la capacidad antioxidante de una muestra, existen diversos métodos y cada uno se adapta a objetivos diferentes, como se mencionó anteriormente. Ya que no existe un método estandarizado para cualquier tipo de muestra, los expertos recomiendan que se lleven a cabo las evaluaciones con una gran cantidad de condiciones de oxidación y

empleando diferentes métodos de análisis o medición ⁷⁶. Debido a esto, en este estudio se realizaron los dos ensayos antes mencionados dado a las deficiencias que presentan algunas técnicas de evaluación.

Los carotenoides, como la astaxantina, se encuentran entre los grupos conocidos como cromóforos biológicos, dichos compuestos presentan un rango de absorción equivalente a los 400-550 nm ⁷⁰. El método DPPH para la determinación de la actividad antioxidante, emplea una longitud de onda 515 nm ²³, por lo que en muchas ocasiones este método es insuficiente para obtener datos confiables y reportar la actividad de estos compuestos, ya que los mismos se consideran como una interferencia en el ensayo ⁵⁴, como lo fue en este caso en particular.

Este método está basado en el cambio de color que se da debido a la reducción del radical utilizado como referencia, por la presencia de los antioxidantes en la muestra analizada ⁵⁴. Los antioxidantes son los encargados de donar un átomo de hidrógeno, para que ocurra la reducción del radical y generar un compuesto mucho más estable ⁷⁷. El ensayo proporciona datos de absorbancia a una longitud de onda específica, sin embargo, los resultados obtenidos, mostraron absorbancias negativas (Anexo 9, Cuadro 24). En otras palabras, no hubo presencia de antioxidantes que ocasionaran la reducción del radical DPPH, y por lo tanto esta técnica no generó datos concluyentes con los cuales se pudiera expresar la actividad antioxidante del extracto empleado. No obstante, se analizaron los extractos empleando un método mucho más eficaz como lo fue el conocido como ORAC.

Los extractos se analizaron empleando el método de ORAC para determinar la capacidad antioxidante de los mismos, la cual fluctuó en un rango de $71,9 \pm 0,3$ a $95,8 \pm 1,9$ $\mu\text{mol ET/g MS}$. Como se pudo observar en el cuadro anterior, el sistema de cultivo denominado C₃ presentó el menor valor, con lo que se concluyó que en este sistema hubo una menor producción de antioxidantes. Mientras que el sistema C₁ y C₂ mostraron valores relativamente similares entre sí.

El método ORAC utilizado se basa también en la transferencia de átomos de hidrógeno, donde los antioxidantes presentes en la muestra compiten con el sustrato o comúnmente conocido como sonda, por los radicales libres ⁷⁶. Rodríguez *et al*, realizaron una investigación utilizando diferentes metabolitos secundarios, donde concluyeron que la

capacidad antioxidante empleando el método ORAC está directamente relacionada con la presencia y cantidad de grupos hidroxilo en la muestra analizada ⁷⁶. Además, los carotenoides poseen dobles enlaces conjugados que permiten la deslocalización de los electrones deteriorados ⁷⁸.

La astaxantina es una molécula que posee cierto carácter polar ⁷⁸, pertenece al grupo de las xantofilas, que son compuestos que presentan oxígeno en su composición, específicamente en forma de grupos hidroxilo, en este caso la astaxantina posee dos ⁴¹. Los resultados demuestran que la actividad antioxidante reportada por parte de los extractos analizados se debió a la capacidad que posee la astaxantina de donar átomos de hidrógeno dado a la presencia de los dos grupos hidroxilo presentes en su estructura química. La protección ejercida frente a la degradación oxidativa está relacionada con la presencia de estos grupos así como de la reactividad de la molécula antioxidante ⁷⁶.

Investigadores nacionales, determinaron la capacidad de eliminación de radicales por medio del método ORAC, utilizando frutos de *Sechium edule* (chayote) producidas en el país. En dicho estudio se determinó una capacidad con un rango de $25,5 \pm 1,8 - 31,1 \pm 2,6$ $\mu\text{mol ET/g}$ al utilizar 10 gramos de muestra ²³. La capacidad antioxidante obtenida con los extractos crudos de astaxantina sobrepasa los valores obtenidos por Parra *et al*, alrededor de un 65%, con una cantidad menor biomasa utilizada, concretamente 10 mg. Es importante aclarar que las matrices son diferentes, sin embargo, el principio químico del método es el mismo. Esto demuestra la gran capacidad antioxidante que presentan los carotenoides, específicamente la astaxantina, obtenidos de microorganismos fotosintéticos como la microalga *H.pluvialis*.

La cadena lineal con enlaces dobles de la astaxantina es capaz de atravesar la membrana celular, permitiendo de esta manera que los extremos polares de la molécula se sitúen en el citoplasma. Esta conformación permite con mayor facilidad la transferencia de los electrones, por lo que se considera a los anillos terminales como los captadores de las especies reactivas de oxígeno ⁷⁸.

Régnier *et al*, evaluaron la capacidad antioxidante de unos extractos obtenidos de *H.pluvialis* procedente de las costas de Chile. Los resultados obtenidos demostraron que al utilizar concentraciones equivalentes tanto de astaxantina sintética como de los extractos de

origen natural, estos últimos presentaron una mayor actividad de captación de radicales libres en comparación a la astaxantina comercial ⁷⁸. Lo que demuestra que las fuentes naturales de metabolitos secundarios son más beneficiosas para los organismos que consumen estos compuestos.

La microalga produce en su mayoría astaxantina en forma esterificada, y las muestras utilizadas para determinar la capacidad antioxidante de este estudio fueron los extractos crudos donde se reportó la mayor concentración de astaxantina, es decir, utilizando la biomasa producida en la curva al aplicar la mayor intensidad lumínica. Actualmente se debate si la capacidad antioxidante pueda aumentar o disminuir utilizando astaxantina en su forma libre o en su forma esterificada. Algunos estudios informaron que la astaxantina libre genera una mayor captación de radicales libres, mientras que otras investigaciones le deben ese poder antioxidante a los ésteres de astaxantina, específicamente a los diésteres que dicha molécula forma al unirse a los ácidos grasos presentes en las células de la microalga

⁷⁸.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Conclusiones

Se pudo observar que la microalga *H.pluvialis* presentó un crecimiento relativamente corto utilizando el medio BG-11 en comparación con otros estudios, donde se muestra que la microalga debe cosecharse a los 9 días de iniciado el proceso de cultivo utilizando las condiciones que se describen en esta investigación.

Con respecto a la evaluación del crecimiento de la microalga utilizando medio BG-11 se obtuvo una concentración celular de $1,26 \times 10^6$ cel/mL, un dato bastante aceptable y dentro de los rangos reportados en estudios anteriores, con la aplicación de otros medios de cultivo.

El medio BG-11 se caracterizó por utilizar sales de diferente composición y de fácil adquisición, necesarias para el buen crecimiento de esta microalga, además es un medio bastante económico en comparación con algunos medios que son enriquecidos con vitaminas que poseen un valor monetario elevado.

La microalga *H.pluvialis* requiere de las condiciones adecuadas que aseguren su crecimiento, por lo que es importante optar por el medio de cultivo con las características apropiadas para el desarrollo del ciclo celular de las células.

Es de vital importancia identificar primeramente la cepa de microalga utilizada, ya que con dicha información se pueden mejorar la productividad tanto de biomasa como de carotenoides, ayudando a reducir de manera significativa los costos de producción, así como los tiempos de cosecha.

La concentración máxima de astaxantina reportada utilizando una intensidad lumínica de $200 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$ fue de $1,69 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, en el día 23. Sin embargo, fue relativamente baja debido a que la cantidad de astaxantina en su forma libre representa alrededor del 10% de la total producida.

Intensidades de luz altas ayudan a la producción del contenido de astaxantina, sin embargo, el utilizar valores muy elevados provoca que el cultivo entre en la fase de muerte celular.

Las concentraciones obtenidas aplicando las dos intensidades propuestas, son muy parecidas, sin embargo, se acorta el tiempo de producción astaxantina con una concentración similar, al utilizar la máxima exposición de luz, es decir $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

La mayor actividad antioxidante, utilizando el método ORAC, se presentó en el sistema de cultivo C_1 con un valor de $95,8 \pm 1,9 \mu\text{mol ET/g MS}$. Los sistemas de cultivo restantes presentaron valores similares.

La capacidad antioxidante está relacionada con la presencia de los grupos hidroxilos presentes en los anillos terminales de los carotenoides, así como a su sistema de dobles enlaces en la cadena no polar de la molécula.

A pesar de que se utilizaron extractos crudos para determinar la actividad antioxidante, los mismos dieron valores aceptables, en comparación con otros estudios, utilizando diferentes matrices.

Es fundamental la realización de varios métodos para evaluar la capacidad antioxidante de las muestras, ya que algunas técnicas presentan dificultades. Además de que no existe un método estandarizado para cualquier muestra sin importar su matriz.

- **Recomendaciones**

Investigar y emplear otros medios de cultivo que favorezcan un crecimiento más acelerado de la microalga. Donde se vea reflejado un mayor crecimiento en un corto lapso, con el fin de ahorrar recursos y tiempo.

El proceso de crecimiento de la microalga está influenciado por diversas variables como temperatura, pH, salinidad; por eso es importante variar más de uno de estos factores para fomentar una mayor productividad de biomasa.

Por otro lado, se deberían de aplicar otros factores de estrés como la deficiencia de macronutrientes, especialmente el nitrógeno, además de la intensidad lumínica; para generar un mayor contenido de astaxantina en las células.

Dado que muchos factores pueden influenciar en el contenido de biomasa, así como de concentración de astaxantina, es indispensable realizar los ensayos en biorreactores, donde se tenga un mayor control de estas variables, como pH, dióxido de carbono y demás.

Se deben realizar los muestreos en los mismos días, para evitar variaciones y así poder aplicar un análisis estadístico más eficiente, que indique si hay variaciones del contenido de astaxantina con respecto al tiempo, ya que una variable es dependiente de la otra.

La microalga *H.pluvialis* produce alrededor del 5-10% de astaxantina en su forma libre, por lo que es necesario que se realicen las reacciones respectivas para la hidrólisis de las moléculas mono y diesterificadas, con el fin de aumentar el contenido total del pigmento.

Debido a que los cambios abruptos de intensidad lumínica generan la pérdida de células, es importante que el aumento de la misma se lleva a cabo de forma gradual cada dos días, desde la aplicación de mayor radiación, para evitar la muerte celular.

Es fundamental la hidrólisis de los ésteres de astaxantina para comprobar si la actividad antioxidante aumenta o disminuye, ya que los estudios realizados con anterioridad no

concuerdan entre sí, si este potencial se debe a el compuesto en su forma libre o a sus ésteres.

Realizar un espectro de masas a los extractos obtenidos, para identificar la presencia de los ácidos grasos que poseen las células de la microalga *H.pluvialis* con el fin de establecer cuáles son los monoésteres y diésteres que genera la astaxantina al asociarse con estos ácidos grasos.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS

- (1) Herrero, M., Simó, C., García-Cañas, V., Ibáñez, E., and Cifuentes, A. (2012) Foodomics: MS-Based Strategies in Modern Food Science and Nutrition. *Mass Spectrom. Rev.* 31, 49–69.
- (2) Sánchez Camargo, A. del P. Desarrollo de Nuevas Estrategias de Extracción para la Obtención de Compuestos Bioactivos. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Abril, 2017.
- (3) Maplestone, R. A., Stone, M. J., and Williams, D. H. (1992) The Evolutionary Role of Secondary Metabolites-a Review*. *Gene* 115, 151–157.
- (4) Pérez-Alonso, N., and Jiménez, E. (2011) Producción de Metabolitos Secundarios de Plantas Mediante el Cultivo in vitro. *Biotechnol. Veg.* 11, 195–211.
- (5) Pasquet, V., Chérourvriér, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P., and Picot, L. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* 46, 59–67.
- (6) Gong, M., and Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* 34, 1396–1412.
- (7) Guedes, A. C., Amaro, H. M., and Malcata, F. X. (2011) Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnol. Prog.* 27, 597–613.
- (8) Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D. P., Kaul, S., and Garg, M. O. (2015) Algae based biorefinery - How to make sense? *Renew. Sustain. Energy Rev.* 47, 295–307.
- (9) Nguyen, H. S. H., Hachemi, I., Rudnas, A., Mäki-Arvela, P., Smeds, A., Aho, A., Hemming, J., Peurla, M., and Murzin, D. Y. (2016) Extraction of Lipids from Chlorella Alga by Supercritical Hexane and Demonstration of Their Subsequent Catalytic Hydrodeoxygenation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 55, 10626–10634.
- (10) Maadane, A., Merghoub, N., Ainane, T., El Arroussi, H., Benhima, R., Amzazi, S., Bakri, Y., and Wahby, I. (2015) Antioxidant activity of some Moroccan marine microalgae: Pufa profiles, carotenoids and phenolic content. *J. Biotechnol.* 215, 13–19.
- (11) Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., and Zhang, X. (2014) Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *J. Agric. Food Chem.* 62, 9211–9222.
- (12) Panis, G., and Carreon, J. R. (2016) Commercial astaxanthin production derived by green alga Haematococcus pluvialis: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.* 18, 175–190.
- (13) Herrera-Andrade, M. H., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Núñez-Gastélum, J. A., and Moreno-Ramos, O. H. (2011) Extracción de la astaxantina y su estabilidad. *Rev. Latinoam. Recur. Nat.* 7, 21–27.

- (14) Koller, M., Muhr, A., and Brauneegg, G. (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res.* 6, 52–63.
- (15) Fassett, R. G., and Coombes, J. S. (2011) Astaxanthin: A potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Mar. Drugs* 9, 447–465.
- (16) Brendler, T., and Williamson, E. M. (2019) Astaxanthin: How much is too much? A safety review. *Phyther. Res.* 33, 3090–3111.
- (17) Marz, U. (2015) The Global Market for Carotenoids - FOD025E. *Bus. Commun. Co.*
- (18) Silva-Benavides, A. M., Sili, C., and Torzillo, G. (2008) Cyanoprocaryota y microalgas (Chlorophyceae y Bacillariophyceae) bentónicas dominantes en ríos de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 56, 221–235.
- (19) León, C.; Cháves, D. (2010) Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aquinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Ambient. Algal* 1, 155–177.
- (20) Scholz, C., and Villalobos, N. (2013) Presencia del alga *Chlamydomonas vesterbottnica* (Chlamydomonadales: Chlamydomonadaceae) en los estanques de la planta de tratamiento de un relleno sanitario en Costa Rica. *UNED Res. J.* 5, 185–187.
- (21) Ibañez, E., and Herrero, M. (2017) Capítulo 1. ¿Qué son las Algas?, in *¿Qué Sabemos de? Las Algas que Comemos*, pp 1–8. Madrid.
- (22) Satyanarayana, K. G., Mariano, A. B., and Vargas, J. V. C. (2011) A Review on Microalgae, a Versatile Source for Sustainable Energy and Materials. *Int. J. Energy Res.* 35, 291–311.
- (23) Parra, J., Hernández, P., Ocampo-Maroto, F., Álvarez-Valverde, V., Carvajal-Miranda, Y., Rodríguez-Rodríguez, G., and Herrera, C. (2018) Phytochemical characterization and antioxidant profile of *Sechium edule* (Jacq) Swartz (Cucurbitaceae) varieties grown in Costa Rica. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.* 6, 448–457.
- (24) Leandro, A., Pereira, L., and Gonçalves, A. M. M. (2020) Diverse applications of marine macroalgae. *Mar. Drugs* 18, 1–15.
- (25) Del Pozo Pérez, Á. (2014) Producción y Valorización de Biomasa de Microalgas: un Enfoque de Biorrefinería: en el Hombre y el Medio Ambiente: XIV Jornadas Ambientales (Salamanca, E. U. de, Ed.) 1st ed. España.
- (26) Tandeau de Marsac, N., and Houmard, J. (1993) Adaptation of Cyanobacteria to Environmental Stimuli: New Steps Towards Molecular Mechanisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 104, 119–189.
- (27) Granda, G. P. Producción de Astaxantina a Partir de la Microalga *Haematococcus Pluvialis*. Tesis de Pregrado, Universidad de las Américas, Quito, 2015.
- (28) Reyes, F. A., Mendiola, J. A., Ibañez, E., and Del Valle, J. M. (2014) Astaxanthin

extraction from *Haematococcus pluvialis* using CO₂-expanded ethanol. *J. Supercrit. Fluids* 92, 75–83.

(29) Ramírez Landínez, D. M. (2013) Evaluación del Crecimiento y Producción de Astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un Fotobiorreactor Tipo Airlift. *Dep. Ing. Química y Ambient.* Universidad Nacional de Colombia.

(30) Han, D., Li, Y., and Hu, Q. (2013) Biology and commercial aspects of *Haematococcus pluvialis* BT - absorption and adsorption of heavy metals by microalgae, in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. (Hu., A. R. and Q., Ed.) Second Edi., pp 388–405.

(31) Posten, C., and Walter, C. (2012) *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*. (Gruyter, W. de, Ed.). Berlin.

(32) Nkurunziza, O. Astaxanthin Production from *Haematococcus Pluvialis* Under Various Light Intensities and Carbon Dioxide Concentrations. Tesis de Mestría, Michigan Technological University, Estados Unidos, 2014.

(33) Arredondo, B. O., and Voltolina, D. (2017) Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación la Biomasa Microalgal*. (Noroeste, C. de I. B. del, Ed.). Baja California Sur.

(34) Salgueiro Fernández, J. L. Cultivo de microalgas en aguas residuales y aprovechamiento energético de la biomasa algal. Tesis Doctoral, Universidad de Vigo, España, 2018.

(35) Essmann, M. K. (2011) Determinación de Parámetros Biológicos de la Microalga *Isochrysis aff. Galbana*: Comparación de un Fotobioreactor Continuo Versus un Cultivo Batch. Universidad Austral de Chile.

(36) López, J. (1991) Fijación y Movilización Biológica de Nutrientes. (Press, E. C.-C., Ed.). España.

(37) Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M., and Hertweck, C. (2012) Microalgae in the postgenomic era: A blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 761–785.

(38) Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., and León, R. (2015) Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynth. Res.* 125, 423–436.

(39) Meléndez-Martínez, A. J. (2017) Carotenoides en agroalimentación y salud (Terracota, E., Ed.) Pimera Edi. México.

(40) Ceausescu, E. (1984) La Polimerización Estereoespecífica del Isopreno (México, U. N. A. de, Ed.) Primera Ed. México.

(41) Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., and Regal, P. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 56, 49–73.

- (42) Galasso, C., Orefice, I., Pellone, P., Cirino, P., Miele, R., Ianora, A., Brunet, C., and Sansone, C. (2018) On the neuroprotective role of astaxanthin: New perspectives? *Mar. Drugs* 16, 1–16.
- (43) Dong, S., Huang, Y., Zhang, R., Wang, S., and Liu, Y. (2014) Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *haematococcus pluvialis*. *Sci. World J.* 2014, 1–7.
- (44) Fakhri, S., Abbaszadeh, F., Dargahi, L., and Jorjani, M. (2018) Astaxanthin: A mechanistic review on its biological activities and health benefits. *Pharmacol. Res.* 136, 1–20.
- (45) Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., and Aswathanarayana, R. G. (2014) Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Mar. Drugs* 12, 128–152.
- (46) Zhang, W., Wang, J., Wang, J., and Liu, T. (2014) Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresour. Technol.* 158, 329–335.
- (47) Cornejo, D. A. Extracción, Identificación, Cuantificación y Determinación de la Actividad Antioxidante de los Carotenoides Presentes en las Flores de *Senna multiglandulosa* a Través de Cuatro Métodos de Extracción. Tesis de grado, Escuela Politécnica del Ejército, Ecuador, Octubre, 2011.
- (48) Hekimi, S., Lapointe, J., and Wen, Y. (2011) Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21, 569–576.
- (49) Phaniendra, A., Jestadi, D. B., and Periyasamy, L. (2015) Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26.
- (50) Shahidi, F., and Zhong, Y. (2015) Measurement of antioxidant activity. *J. Funct. Foods* 18, 757–781.
- (51) Iglesias, J. (2009) Diseño de Ingredientes Antioxidantes de Origen Natural y su Aplicación en la Estabilización de Productos Derivados de la Pesca. Universidad de Santiago de Compostela.
- (52) Niki, E. (2011) Antioxidant capacity: Which capacity and how to assess it? *J. Berry Res.* 1, 169–176.
- (53) Zulueta, A., Esteve, M. J., and Frígola, A. (2009) ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chem.* 114, 310–316.
- (54) Mateos-Martín, M. L. Relación Estructura/Actividad de Proantocianidinas Obtenidas de Diversas Fuentes Naturales de Origen Vegetal. Tesis Doctoral, Iniversitat de Barcelona, España, Noviembre, 2013.
- (55) Gutiérrez, D. Ma., Ortiz, C. A., and Mendoza, A. (2008) Medición de Fenoles y

- Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simp. Metrol.* 1–5.
- (56) López-Alarcón, C., and Denicola, A. (2013) Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal. Chim. Acta* 763, 1–10.
- (57) Martínez, K. Establecimiento de las Condiciones de Cultivo de Cianobacterias Fijadoras de Nitrógeno, Aisladas de Suelos Cultivados de Papaya. Tesis de Maestría, Universidad del Mar, México, Agosto, 2010.
- (58) Niño, C., Rivera Rodríguez, F. C., Díaz, L. E., and Díaz Lancheros, A. G. (2017) Evaluation of Cell Growth Conditions for the Astaxanthin Production as of *Haematococcus pluvialis* Microalgae. *Nova* 15, 19–31.
- (59) Colusse, G. A., Duarte, M. E. R., de Carvalho, J. C., and Nosedá, M. D. (2019) Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. *Bioresour. Technol. Reports* 7, 100236.
- (60) Sánchez, A. Productividad de la Biomasa y Producción de Metabolitos Secundarios en el Co-cultivo de las Microalgas Dulceacuícolas *Chlorella sorokiniana* y *Desmodesmus communis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Costa Rica, Costa Rica, 2020.
- (61) Brescia, P. J. (2012) Determination of Antioxidant potential using an Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay with Synergy™ H4. *BioTek Appl. Note* 4–12.
- (62) Hernández, A. M. (2019) Producción de Biomasa de la Microalga *Haematococcus pluvialis* Utilizando los Medios de Cultivo OHM Y Kobayashi en el Biorreactor TECFERM de 5 Litros. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- (63) Xi, T., Kim, D. G., Roh, S. W., Choi, J. S., and Choi, Y. E. (2016) Enhancement of astaxanthin production using *Haematococcus pluvialis* with novel LED wavelength shift strategy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 6231–6238.
- (64) Salazar, M., Monroy, O., Beristain, R., Cuevas, F., and Mendoza, C. (2012) Influencia del medio de cultivo en el crecimiento de *Haematococcus pluvialis*. *IX Congr. Nac. Biotecnol. y Bioingeniería*.
- (65) Guajardo, C. Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Contenido de Lípidos y Carotenoides Totales en un Extracto Hexánico de *Haematococcus pluvialis* en Distintos Periodos de Estrés. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Nuevo León, México, Diciembre, 2019.
- (66) Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., and Wang, G. (2011) An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv.* 29, 568–574.
- (67) García-Malea, M. C., Acién, F. G., Fernández, J. M., Cerón, M. C., and Molina, E. (2006) Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 981–989.

- (68) Christwardana, M., and Hadiyanto, H. (2017) The Effects of Audible Sound for Enhancing the Growth Rate of Microalgae *Haematococcus pluvialis* in Vegetative Stage. *HAYATI J. Biosci.* 24, 149–155.
- (69) Kiperstok, A. C., Sebestyén, P., Podola, B., and Melkonian, M. (2017) Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. *Algal Res.* 21, 213–222.
- (70) Masojídek, J., Torzillo, G., and Koblížek, M. (2013) Photosynthesis in Microalgae, in *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, pp 21–36.
- (71) Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Ke, H., Zheng, X., Chen, D., Wang, C., Wu, S., and An, Y. (2019) Differences between motile and nonmotile cells of *haematococcus pluvialis* in the production of astaxanthin at different light intensities. *Mar. Drugs* 17, 1–14.
- (72) Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., and Murray, P. (2013) Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 128, 118–124.
- (73) Nishshanka, S. H., Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., and Nimarshana, V. (2021) Sustainable Cultivation of *Haematococcus pluvialis* for the Production of Natural Astaxanthin. *2021 Moratuwa Eng. Res. Conf.* 297–302.
- (74) Oncel, S. S., Imamoglu, E., Gunerken, E., and Sukan, F. V. (2011) Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86, 414–420.
- (75) Miyakawa, K. Commercial Production of Astaxanthin from the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. En *Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches*; Misawa, N; Editorial Springer: Singapur, 2021; volumen 1261, pp 3-10.
- (76) Rodríguez-Bonilla, P., Gandía-Herrero, F., Matencio, A., García-Carmona, F., and López-Nicolás, J. M. (2017) Comparative Study of the Antioxidant Capacity of Four Stilbenes Using ORAC, ABTS+, and FRAP Techniques. *Food Anal. Methods* 10, 2994–3000.
- (77) Tan, Y., Ye, Z., Wang, M., Manzoor, M. F., Aadil, R. M., Tan, X., and Liu, Z. (2021) Comparison of different methods for extracting the astaxanthin from *haematococcus pluvialis*: Chemical composition and biological activity. *Molecules* 26, 1-13.
- (78) Régnier, P., Bastias, J., Rodriguez-Ruiz, V., Caballero-Casero, N., Caballo, C., Sicilia, D., Fuentes, A., Maire, M., Crepin, M., Letourneur, D., Gueguen, V., Rubio, S., and Pavon-Djavid, G. (2015) Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. *Mar. Drugs* 13, 2857–2874.

ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de la microalga *H.pluvialis*.

Cuadro 9. Formulación del medio de cultivo BG-11 empleado para la generación de las curvas de crecimiento ⁵⁷.

Compuesto químico	Concentración por litro de medio (g/L)
NaNO ₃	1,5
K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O	0,4
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,075
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,036
Ácido cítrico	0,006
Citrato férrico de amonio	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,020
Metales traza *	1 mL/L

Cuadro 10. Formulación de la disolución de metales trazas *.

Compuesto químico	Concentración g/100 mL
H ₃ BO ₃	0,286
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,181
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,0222
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,039
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,0079
Co(NO ₃) ₂ * 6 H ₂ O	0,00494

Anexo 2. Condiciones de intensidad de luz utilizadas en la elaboración de las curvas de crecimiento de la microalga *H.pluvialis*.

Cuadro 11. Mediciones de las intensidades de luz empleadas en los experimentos para la obtención de las curvas de crecimiento.

Cultivo	Duración	Intensidad de luz	
		$\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$	Lux
Condiciones iniciales	Todo el proceso de cultivo	70-72	4300-4500
Primera variación de intensidad de luz	0-8 días	72-73	4300-4500
	9-24 días	151-154	8400-8500
Segunda variación de intensidad de luz	0-9 días	71-74	4600-4900
	10-23 días	203-208	10500-10800

Anexo 3. Resultados obtenidos para la generación de las curvas bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Cuadro 12. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en peso seco.

Sistema	M	Rep	P. inicial ($\pm 0,0001$ g)	P. final ($\pm 0,0001$ g)	P. biomasa ($\pm 0,0001$ g)	Promedio ($\pm 0,0001$ g)	Concentración (g/L)	Tiempo (días)
1	1	1	0,0963	0,0978	0,0015	0,0018	0,3533 \pm 0,0003	0
		2	0,0957	0,0977	0,0020			
		3	0,0960	0,0978	0,0018			
	2	1	0,0971	0,0986	0,0015	0,0019	0,3867 \pm 0,0004	1
		2	0,0976	0,0997	0,0021			
		3	0,0962	0,0984	0,0022			
	3	1	0,0961	0,0978	0,0017	0,0015	0,3000 \pm 0,0003	2
		2	0,0951	0,0964	0,0013			
		3	0,0951	0,0966	0,0015			
	4	1	0,0899	0,0926	0,0027	0,0026	0,5133 \pm 0,0002	3
		2	0,0911	0,0935	0,0024			
		3	0,0913	0,0939	0,0026			
	5	1	0,0918	0,0954	0,0036	0,0032	0,6467 \pm 0,0006	5
		2	0,0915	0,0951	0,0036			
		3	0,0919	0,0944	0,0025			
	6	1	0,0922	0,0960	0,0038	0,0040	0,8000 \pm 0,0002	6
		2	0,0898	0,0939	0,0041			
		3	0,0909	0,0950	0,0041			
	7	1	0,0916	0,0975	0,0059	0,0057	1,1467 \pm 0,0002	7
		2	0,0911	0,0969	0,0058			
		3	0,0906	0,0961	0,0055			

Sistema	M	Rep	P. inicial ($\pm 0,0001g$)	P. final ($\pm 0,0001g$)	P. biomasa ($\pm 0,0001g$)	Promedio ($\pm 0,0001g$)	Concentración (g/L)	Tiempo (h)
1	8	1	0,0923	0,0982	0,0059	0,0060	1,1933 $\pm 0,0001$	8
		2	0,0922	0,0981	0,0059			
		3	0,0920	0,0981	0,0061			
	9	1	0,0951	0,1016	0,0065	0,0068	1,3600 $\pm 0,0004$	9
		2	0,0954	0,1020	0,0066			
		3	0,0947	0,1020	0,0074			
	10	1	0,0952	0,1042	0,0090	0,0090	1,8067 $\pm 0,0001$	12
		2	0,0952	0,1042	0,0090			
		3	0,0954	0,1045	0,0091			
	11	1	0,0948	0,1064	0,0116	0,0108	2,1667 $\pm 0,0007$	13
		2	0,0933	0,1037	0,0104			
		3	0,0956	0,1061	0,0105			
2	1	1	0,0956	0,0971	0,0015	0,0012	0,2400 $\pm 0,0003$	0
		2	0,0962	0,0973	0,0011			
		3	0,0975	0,0985	0,0010			
	2	1	0,0961	0,0976	0,0015	0,0013	0,2600 $\pm 0,0002$	1
		2	0,0955	0,0967	0,0012			
		3	0,0988	0,1000	0,0012			
	3	1	0,0963	0,0975	0,0012	0,0013	0,2667 $\pm 0,0002$	2
		2	0,0941	0,0954	0,0013			
		3	0,0904	0,0919	0,0015			
	4	1	0,0908	0,0933	0,0025	0,0026	0,5267 $\pm 0,0002$	3
		2	0,0909	0,0938	0,0029			
		3	0,0897	0,0922	0,0025			

Sistema	M	Rep	P. inicial (±0,0001g)	P. final (±0,0001g)	P. biomasa (±0,0001g)	Promedio (±0,0001g)	Concentración (g/L)	Tiempo (días)
2	5	1	0,0915	0,0948	0,0033	0,0032	0,6333±0,0001	5
		2	0,0913	0,0944	0,0031			
		3	0,0918	0,0949	0,0031			
	6	1	0,0912	0,0951	0,0039	0,0040	0,7933±0,0001	6
		2	0,0907	0,0946	0,0039			
		3	0,0906	0,0947	0,0041			
	7	1	0,0897	0,0958	0,0061	0,0059	1,1800±0,0005	7
		2	0,0918	0,0981	0,0063			
		3	0,0913	0,0966	0,0053			
	8	1	0,0912	0,0977	0,0065	0,0063	1,2667±0,0002	8
		2	0,0916	0,0979	0,0063			
		3	0,0924	0,0986	0,0062			
	9	1	0,0944	0,1021	0,0077	0,0078	1,5533±0,0004	9
		2	0,0942	0,1024	0,0082			
		3	0,0938	0,1012	0,0074			
	10	1	0,0954	0,1053	0,0099	0,0098	1,9600±0,0004	12
		2	0,0949	0,1050	0,0101			
		3	0,0946	0,1040	0,0094			
11	1	0,0954	0,1063	0,0109	0,0111	2,2200±0,0002	13	
	2	0,0950	0,1061	0,0111				
	3	0,0946	0,1059	0,0113				
3	1	1	0,0972	0,0983	0,0011	0,0011	0,2200±0,0001	0
		2	0,0972	0,0984	0,0012			
		3	0,0963	0,0973	0,0010			

Sistema	M	Rep	P. inicial (±0,0001g)	P. final (±0,0001g)	P. biomasa (±0,0001g)	Promedio (±0,0001g)	Concentración (g/L)	Tiempo (días)
3	2	1	0,0972	0,0984	0,0012	0,0013	0,2667±0,0002	1
		2	0,0957	0,0972	0,0015			
		3	0,0952	0,0965	0,0013			
	3	1	0,0899	0,0912	0,0013	0,0015	0,2933±0,0002	2
		2	0,0904	0,0920	0,0016			
		3	0,0911	0,0926	0,0015			
	4	1	0,0916	0,0947	0,0031	0,0028	0,5600±0,0004	3
		2	0,0910	0,0939	0,0029			
		3	0,0910	0,0934	0,0024			
	5	1	0,0915	0,0951	0,0036	0,0031	0,6267±0,0005	5
		2	0,0920	0,0951	0,0031			
		3	0,0923	0,0950	0,0027			
	6	1	0,0906	0,0945	0,0039	0,0039	0,7867±0,0004	6
		2	0,0918	0,0954	0,0036			
		3	0,0900	0,0943	0,0043			
	7	1	0,0913	0,0961	0,0048	0,0042	0,8467±0,0005	7
		2	0,0913	0,0953	0,0040			
		3	0,0914	0,0953	0,0039			
	8	1	0,0922	0,0978	0,0056	0,0053	1,0600±0,0003	8
		2	0,0912	0,0965	0,0053			
		3	0,0962	0,1012	0,0050			
	9	1	0,0956	0,1022	0,0066	0,0060	1,2067±0,0007	9
		2	0,0951	0,1013	0,0062			
		3	0,0957	0,1010	0,0053			

Sistema	M	Rep	P. inicial ($\pm 0,0001\text{g}$)	P. final ($\pm 0,0001\text{g}$)	P. biomasa ($\pm 0,0001\text{g}$)	Promedio ($\pm 0,0001\text{g}$)	Concentración (g/L)	Tiempo (días)
3	10	1	0,0952	0,1021	0,0069	0,0068	1,3667 $\pm 0,0001$)	12
		2	0,0955	0,1024	0,0069			
		3	0,0956	0,1023	0,0067			
	11	1	0,0945	0,1027	0,0082	0,0078	1,5600 $\pm 0,0004$)	13
		2	0,0949	0,1027	0,0078			
		3	0,0955	0,1029	0,0074			

* M: muestra
Rep: repetición
P: peso

Cuadro 13. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga *H.pluvialis* basada en peso seco.

Concentración promedio (g/L)	Tiempo (días)
0,27 $\pm 0,07$	0
0,30 $\pm 0,07$	1
0,29 $\pm 0,02$	2
0,53 $\pm 0,02$	3
0,64 $\pm 0,01$	5
0,79 $\pm 0,01$	6
1,06 $\pm 0,18$	7
1,17 $\pm 0,10$	8
1,37 $\pm 0,17$	9
1,71 $\pm 0,31$	12
1,98 $\pm 0,37$	13

Cuadro 14. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en conteo celular.

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	1	1	$1,60 \times 10^5$	$6,33 \times 10^4 \pm 8,39 \times 10^4$	0
		2	$2,00 \times 10^4$		
		3	$1,00 \times 10^4$		
	2	1	$3,00 \times 10^4$	$8,33 \times 10^4 \pm 5,03 \times 10^4$	1
		2	$9,00 \times 10^4$		
		3	$1,30 \times 10^5$		
	3	1	$2,10 \times 10^5$	$2,10 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^4$	2
		2	$2,20 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	4	1	$1,30 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5 \pm 9,71 \times 10^4$	3
		2	$3,20 \times 10^5$		
		3	$1,90 \times 10^5$		
	5	1	$2,90 \times 10^5$	$4,10 \times 10^5 \pm 2,34 \times 10^5$	5
		2	$2,60 \times 10^5$		
		3	$6,80 \times 10^5$		
	6	1	$5,60 \times 10^5$	$4,70 \times 10^5 \pm 9,00 \times 10^4$	6
		2	$4,70 \times 10^5$		
		3	$3,80 \times 10^5$		
	7	1	$9,10 \times 10^5$	$8,50 \times 10^5 \pm 1,04 \times 10^5$	7
		2	$7,30 \times 10^5$		
		3	$9,10 \times 10^5$		
	8	1	$1,27 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6 \pm 3,34 \times 10^5$	8
		2	$1,88 \times 10^6$		
		3	$1,34 \times 10^6$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	9	1	$1,60 \times 10^6$	$1,32 \times 10^6 \pm 2,46 \times 10^5$	9
		2	$1,22 \times 10^6$		
		3	$1,14 \times 10^6$		
	10	1	$9,80 \times 10^5$	$1,37 \times 10^6 \pm 3,39 \times 10^5$	12
		2	$1,61 \times 10^6$		
		3	$1,51 \times 10^6$		
	11	1	$1,15 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6 \pm 2,51 \times 10^5$	13
		2	$1,26 \times 10^6$		
		3	$1,63 \times 10^6$		
2	1	1	$9,00 \times 10^4$	$7,33 \times 10^4 \pm 1,53 \times 10^4$	0
		2	$7,00 \times 10^4$		
		3	$6,00 \times 10^4$		
	2	1	$4,00 \times 10^4$	$6,00 \times 10^4 \pm 2,65 \times 10^4$	1
		2	$9,00 \times 10^4$		
		3	$5,00 \times 10^4$		
	3	1	$1,70 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5 \pm 7,55 \times 10^4$	2
		2	$2,60 \times 10^5$		
		3	$1,10 \times 10^5$		
	4	1	$2,20 \times 10^5$	$2,83 \times 10^5 \pm 1,37 \times 10^5$	3
		2	$1,90 \times 10^5$		
		3	$4,40 \times 10^5$		
	5	1	$5,10 \times 10^5$	$6,27 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^5$	5
		2	$1,10 \times 10^6$		
		3	$2,70 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	6	1	$4,50 \times 10^5$	$5,97 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^5$	6
		2	$7,20 \times 10^5$		
		3	$6,20 \times 10^5$		
	7	1	$9,30 \times 10^5$	$9,90 \times 10^5 \pm 4,27 \times 10^5$	7
		2	$9,20 \times 10^5$		
		3	$1,12 \times 10^6$		
	8	1	$6,80 \times 10^5$	$8,33 \times 10^5 \pm 1,93 \times 10^5$	8
		2	$7,70 \times 10^5$		
		3	$1,05 \times 10^6$		
	9	1	$1,39 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^5$	9
		2	$1,16 \times 10^6$		
		3	$1,28 \times 10^6$		
	10	1	$1,42 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^5$	12
		2	$1,67 \times 10^6$		
		3	$1,44 \times 10^6$		
11	1	$1,61 \times 10^6$	$1,70 \times 10^6 \pm 1,25 \times 10^5$	13	
	2	$1,64 \times 10^6$			
	3	$1,84 \times 10^6$			
3	1	1	$6,00 \times 10^4$	$4,33 \times 10^4 \pm 1,53 \times 10^4$	0
		2	$3,00 \times 10^4$		
		3	$4,00 \times 10^4$		
	2	1	$4,00 \times 10^4$	$8,67 \times 10^4 \pm 5,69 \times 10^4$	1
		2	$1,50 \times 10^5$		
		3	$4,00 \times 10^4$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
3	3	1	$2,10 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5 \pm 2,65 \times 10^4$	2
		2	$2,50 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	4	1	$1,60 \times 10^5$	$1,53 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	3
		2	$1,70 \times 10^5$		
		3	$1,30 \times 10^5$		
	5	1	$4,50 \times 10^5$	$3,07 \times 10^5 \pm 1,24 \times 10^5$	5
		2	$2,40 \times 10^5$		
		3	$2,30 \times 10^5$		
	6	1	$6,50 \times 10^5$	$6,03 \times 10^5 \pm 4,51 \times 10^5$	6
		2	$5,60 \times 10^5$		
		3	$6,00 \times 10^5$		
	7	1	$3,60 \times 10^5$	$6,77 \times 10^5 \pm 3,06 \times 10^5$	7
		2	$9,70 \times 10^5$		
		3	$7,00 \times 10^5$		
	8	1	$8,50 \times 10^5$	$9,93 \times 10^5 \pm 1,27 \times 10^5$	8
		2	$1,09 \times 10^6$		
		3	$1,04 \times 10^6$		
	9	1	$8,60 \times 10^5$	$1,18 \times 10^6 \pm 4,21 \times 10^5$	9
		2	$1,03 \times 10^6$		
		3	$1,66 \times 10^6$		
	10	1	$8,30 \times 10^5$	$1,14 \times 10^6 \pm 2,66 \times 10^5$	12
		2	$1,31 \times 10^6$		
		3	$1,27 \times 10^6$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
3	11	1	$1,54 \times 10^6$	$1,41 \times 10^6 \pm 1,70 \times 10^5$	13
		2	$1,22 \times 10^6$		
		3	$1,48 \times 10^6$		

* M: muestra
Rep: repetición

Cuadro 15. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga *H. pluvialis* basada en conteo celular.

Concentración celular promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
$6,00 \times 10^4 \pm 1,53 \times 10^4$	0
$7,67 \times 10^4 \pm 1,45 \times 10^4$	1
$2,03 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	2
$2,16 \times 10^5 \pm 6,51 \times 10^4$	3
$4,48 \times 10^5 \pm 1,63 \times 10^5$	5
$6,57 \times 10^5 \pm 9,82 \times 10^4$	6
$8,36 \times 10^5 \pm 1,62 \times 10^5$	7
$1,11 \times 10^6 \pm 3,48 \times 10^5$	8
$1,26 \times 10^6 \pm 7,21 \times 10^4$	9
$1,34 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^5$	12
$1,49 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^5$	13

Anexo 4. Resultados obtenidos para la generación de las curvas de crecimiento celular utilizando diferentes intensidades de luz como factor de estrés, en el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas.

Cuadro 16. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en el conteo celular empleando una intensidad lumínica de $150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	1	1	$1,50 \times 10^5$	$1,17 \times 10^5 \pm 3,51 \times 10^4$	0
		2	$8,00 \times 10^4$		
		3	$1,20 \times 10^5$		
	2	1	$9,00 \times 10^4$	$1,27 \times 10^5 \pm 3,21 \times 10^4$	1
		2	$1,40 \times 10^5$		
		3	$1,50 \times 10^5$		
	3	1	$1,90 \times 10^5$	$2,07 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	2
		2	$2,30 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	4	1	$2,00 \times 10^5$	$2,30 \times 10^5 \pm 6,08 \times 10^4$	3
		2	$1,90 \times 10^5$		
		3	$3,00 \times 10^5$		
	5	1	$3,10 \times 10^5$	$2,93 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	4
		2	$2,70 \times 10^5$		
		3	$3,00 \times 10^5$		
	6	1	$4,00 \times 10^5$	$4,77 \times 10^5 \pm 6,66 \times 10^4$	5
		2	$5,10 \times 10^5$		
		3	$5,20 \times 10^5$		
	7	1	$4,30 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5 \pm 1,22 \times 10^5$	7
		2	$6,50 \times 10^5$		
		3	$4,50 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	8	1	$7,90 \times 10^5$	$7,90 \times 10^5 \pm 1,80 \times 10^5$	8
		2	$6,10 \times 10^5$		
		3	$9,70 \times 10^5$		
	9	1	$7,60 \times 10^5$	$8,23 \times 10^5 \pm 1,55 \times 10^5$	9
		2	$1,00 \times 10^6$		
		3	$7,10 \times 10^5$		
	10	1	$8,40 \times 10^5$	$8,30 \times 10^5 \pm 1,45 \times 10^5$	10
		2	$6,80 \times 10^5$		
		3	$9,70 \times 10^5$		
	11	1	$8,90 \times 10^5$	$8,93 \times 10^5 \pm 2,25 \times 10^5$	14
		2	$1,12 \times 10^6$		
		3	$6,70 \times 10^5$		
	12	1	$9,40 \times 10^5$	$9,53 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^4$	15
		2	$9,60 \times 10^5$		
		3	$9,60 \times 10^5$		
13	1	$1,01 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6 \pm 2,51 \times 10^5$	17	
	2	$1,44 \times 10^6$			
	3	$1,00 \times 10^6$			
14	1	$1,27 \times 10^6$	$1,23 \times 10^6 \pm 8,72 \times 10^4$	21	
	2	$1,13 \times 10^6$			
	3	$1,29 \times 10^6$			
15	1	$1,32 \times 10^6$	$1,35 \times 10^6 \pm 2,65 \times 10^4$	23	
	2	$1,36 \times 10^6$			
	3	$1,37 \times 10^6$			

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	16	1	$1,68 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6 \pm 1,20 \times 10^5$	24
		2	$1,79 \times 10^6$		
		3	$1,55 \times 10^6$		
2	1	1	$9,00 \times 10^4$	$1,33 \times 10^5 \pm 3,79 \times 10^4$	0
		2	$1,60 \times 10^5$		
		3	$1,50 \times 10^5$		
	2	1	$1,20 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5 \pm 8,39 \times 10^4$	1
		2	$1,10 \times 10^5$		
		3	$2,60 \times 10^5$		
	3	1	$2,80 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5 \pm 6,11 \times 10^4$	2
		2	$1,60 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	4	1	$2,70 \times 10^5$	$2,33 \times 10^5 \pm 8,14 \times 10^4$	3
		2	$2,90 \times 10^5$		
		3	$1,40 \times 10^5$		
	5	1	$3,70 \times 10^5$	$2,63 \times 10^5 \pm 9,71 \times 10^4$	4
		2	$2,40 \times 10^5$		
		3	$1,80 \times 10^5$		
	6	1	$5,10 \times 10^5$	$4,53 \times 10^5 \pm 4,93 \times 10^4$	5
		2	$4,20 \times 10^5$		
		3	$4,30 \times 10^5$		
	7	1	$4,20 \times 10^5$	$5,53 \times 10^5 \pm 2,75 \times 10^5$	7
		2	$3,70 \times 10^5$		
		3	$8,70 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	8	1	$8,70 \times 10^5$	$9,00 \times 10^5 \pm 9,85 \times 10^4$	8
		2	$1,01 \times 10^6$		
		3	$8,20 \times 10^5$		
	9	1	$8,90 \times 10^5$	$8,97 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^5$	9
		2	$8,00 \times 10^5$		
		3	$1,00 \times 10^6$		
	10	1	$8,20 \times 10^5$	$7,63 \times 10^5 \pm 8,96 \times 10^4$	10
		2	$6,60 \times 10^5$		
		3	$8,10 \times 10^5$		
	11	1	$1,27 \times 10^6$	$1,10 \times 10^6 \pm 2,44 \times 10^5$	14
		2	$1,21 \times 10^6$		
		3	$8,20 \times 10^5$		
	12	1	$1,07 \times 10^6$	$1,07 \times 10^6 \pm 4,51 \times 10^4$	15
		2	$1,12 \times 10^6$		
		3	$1,03 \times 10^6$		
	13	1	$1,10 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6 \pm 1,60 \times 10^5$	17
		2	$9,60 \times 10^5$		
		3	$1,28 \times 10^6$		
	14	1	$1,29 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^5$	21
		2	$1,39 \times 10^6$		
		3	$1,81 \times 10^6$		
15	1	$1,58 \times 10^6$	$1,63 \times 10^6 \pm 7,23 \times 10^4$	23	
	2	$1,59 \times 10^6$			
	3	$1,71 \times 10^6$			

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	16	1	$1,48 \times 10^6$	$1,62 \times 10^6 \pm 1,69 \times 10^5$	24
		2	$1,81 \times 10^6$		
		3	$1,58 \times 10^6$		
3	1	1	$1,30 \times 10^5$	$1,67 \times 10^5 \pm 9,07 \times 10^4$	0
		2	$2,70 \times 10^5$		
		3	$1,00 \times 10^5$		
	2	1	$1,90 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5 \pm 9,71 \times 10^4$	1
		2	$1,30 \times 10^5$		
		3	$3,20 \times 10^5$		
	3	1	$2,10 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5 \pm 4,58 \times 10^4$	2
		2	$3,00 \times 10^5$		
		3	$2,70 \times 10^5$		
	4	1	$5,30 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5 \pm 1,81 \times 10^5$	3
		2	$1,90 \times 10^5$		
		3	$2,50 \times 10^5$		
	5	1	$3,40 \times 10^5$	$3,67 \times 10^5 \pm 3,79 \times 10^4$	4
		2	$3,50 \times 10^5$		
		3	$4,10 \times 10^5$		
	6	1	$4,00 \times 10^5$	$3,90 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^4$	5
		2	$3,80 \times 10^5$		
		3	$3,90 \times 10^5$		
	7	1	$3,00 \times 10^5$	$4,83 \times 10^5 \pm 1,96 \times 10^5$	7
		2	$4,60 \times 10^5$		
		3	$6,90 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
3	8	1	$6,30 \times 10^5$	$7,23 \times 10^5 \pm 1,01 \times 10^5$	8
		2	$7,10 \times 10^5$		
		3	$8,30 \times 10^5$		
	9	1	$8,10 \times 10^5$	$6,63 \times 10^5 \pm 1,50 \times 10^5$	9
		2	$5,10 \times 10^5$		
		3	$6,70 \times 10^5$		
	10	1	$7,90 \times 10^5$	$7,97 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	10
		2	$8,20 \times 10^5$		
		3	$7,80 \times 10^5$		
	11	1	$1,26 \times 10^6$	$1,04 \times 10^6 \pm 3,98 \times 10^5$	14
		2	$5,80 \times 10^5$		
		3	$1,28 \times 10^6$		
	12	1	$7,50 \times 10^5$	$9,40 \times 10^5 \pm 1,90 \times 10^5$	15
		2	$1,13 \times 10^6$		
		3	$9,40 \times 10^5$		
	13	1	$8,60 \times 10^5$	$9,67 \times 10^5 \pm 1,10 \times 10^5$	17
		2	$1,08 \times 10^6$		
		3	$9,60 \times 10^5$		
	14	1	$1,01 \times 10^6$	$9,07 \times 10^5 \pm 8,96 \times 10^4$	21
		2	$8,50 \times 10^5$		
		3	$8,60 \times 10^5$		
15	1	$9,80 \times 10^5$	$1,05 \times 10^6 \pm 2,48 \times 10^5$	23	
	2	$8,50 \times 10^5$			
	3	$1,33 \times 10^6$			

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
3	16	1	$7,60 \times 10^5$	$1,10 \times 10^6 \pm 3,14 \times 10^5$	24
		2	$1,16 \times 10^6$		
		3	$1,38 \times 10^6$		

* M: muestra
Rep: repetición

Cuadro 17. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga *H.pluvialis* basada en conteo celular, empleando una intensidad lumínica de $150 \mu\text{mol/m}^2\text{s}$.

Concentración celular promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
$1,39 \times 10^5 \pm 2,55 \times 10^4$	0
$1,68 \times 10^5 \pm 4,32 \times 10^4$	1
$2,27 \times 10^5 \pm 2,90 \times 10^4$	2
$2,62 \times 10^5 \pm 5,28 \times 10^4$	3
$3,08 \times 10^5 \pm 5,35 \times 10^4$	4
$4,40 \times 10^5 \pm 4,49 \times 10^4$	5
$5,15 \times 10^5 \pm 3,53 \times 10^4$	7
$8,04 \times 10^5 \pm 8,94 \times 10^4$	8
$7,94 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$	9
$7,97 \times 10^5 \pm 3,35 \times 10^4$	10
$1,01 \times 10^6 \pm 1,07 \times 10^5$	14
$9,88 \times 10^5 \pm 7,16 \times 10^4$	15
$1,08 \times 10^6 \pm 9,62 \times 10^4$	17
$1,21 \times 10^6 \pm 2,97 \times 10^5$	21
$1,34 \times 10^6 \pm 2,90 \times 10^5$	23
$1,46 \times 10^6 \pm 3,16 \times 10^5$	24

Cuadro 18. Datos obtenidos de los muestreos diarios basados en el conteo celular empleando una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	1	1	$2,20 \times 10^5$	$1,57 \times 10^5 \pm 6,03 \times 10^4$	0
		2	$1,50 \times 10^5$		
		3	$1,00 \times 10^5$		
	2	1	$1,60 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5 \pm 2,00 \times 10^4$	1
		2	$1,80 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	3	1	$1,80 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5 \pm 7,55 \times 10^4$	2
		2	$2,70 \times 10^5$		
		3	$1,20 \times 10^5$		
	4	1	$2,70 \times 10^5$	$2,57 \times 10^5 \pm 1,53 \times 10^4$	3
		2	$2,60 \times 10^5$		
		3	$2,40 \times 10^5$		
	5	1	$3,60 \times 10^5$	$3,77 \times 10^5 \pm 2,89 \times 10^4$	6
		2	$4,10 \times 10^5$		
		3	$3,60 \times 10^5$		
	6	1	$4,90 \times 10^5$	$4,50 \times 10^5 \pm 6,93 \times 10^4$	7
		2	$3,70 \times 10^5$		
		3	$4,90 \times 10^5$		
	7	1	$5,20 \times 10^5$	$5,63 \times 10^5 \pm 5,86 \times 10^4$	8
		2	$6,30 \times 10^5$		
		3	$5,40 \times 10^5$		
	8	1	$6,60 \times 10^5$	$5,97 \times 10^5 \pm 7,09 \times 10^4$	9
		2	$6,10 \times 10^5$		
		3	$5,20 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	9	1	$7,90 \times 10^5$	$6,63 \times 10^5 \pm 1,48 \times 10^5$	10
		2	$7,00 \times 10^5$		
		3	$5,00 \times 10^5$		
	10	1	$8,70 \times 10^5$	$1,21 \times 10^6 \pm 3,45 \times 10^5$	13
		2	$1,20 \times 10^6$		
		3	$1,56 \times 10^6$		
	11	1	$1,05 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6 \pm 4,51 \times 10^4$	14
		2	$1,09 \times 10^6$		
		3	$1,14 \times 10^6$		
	12	1	$1,16 \times 10^6$	$1,17 \times 10^6 \pm 5,77 \times 10^3$	15
		2	$1,17 \times 10^6$		
		3	$1,17 \times 10^6$		
	13	1	$1,24 \times 10^6$	$1,22 \times 10^6 \pm 2,41 \times 10^5$	16
		2	$1,45 \times 10^6$		
		3	$9,70 \times 10^5$		
	14	1	$1,44 \times 10^6$	$1,20 \times 10^6 \pm 2,30 \times 10^5$	17
		2	$1,19 \times 10^6$		
		3	$9,80 \times 10^5$		
	15	1	$9,80 \times 10^5$	$1,10 \times 10^6 \pm 1,01 \times 10^5$	21
		2	$1,15 \times 10^6$		
		3	$1,16 \times 10^6$		
	16	1	$1,02 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6 \pm 4,58 \times 10^4$	22
		2	$9,60 \times 10^5$		
		3	$1,05 \times 10^6$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
1	17	1	$1,00 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6 \pm 1,73 \times 10^4$	23
		2	$1,03 \times 10^6$		
		3	$1,00 \times 10^6$		
2	1	1	$9,00 \times 10^4$	$1,47 \times 10^5 \pm 1,07 \times 10^5$	0
		2	$2,70 \times 10^5$		
		3	$8,00 \times 10^4$		
	2	1	$1,60 \times 10^5$	$1,83 \times 10^5 \pm 2,08 \times 10^4$	1
		2	$1,90 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	3	1	$1,70 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5 \pm 4,58 \times 10^4$	2
		2	$2,30 \times 10^5$		
		3	$2,60 \times 10^5$		
	4	1	$2,60 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5 \pm 2,65 \times 10^4$	3
		2	$2,70 \times 10^5$		
		3	$2,20 \times 10^5$		
	5	1	$3,90 \times 10^5$	$3,60 \times 10^5 \pm 4,36 \times 10^4$	6
		2	$3,10 \times 10^5$		
		3	$3,80 \times 10^5$		
	6	1	$4,80 \times 10^5$	$4,37 \times 10^5 \pm 5,13 \times 10^4$	7
		2	$3,80 \times 10^5$		
		3	$4,50 \times 10^5$		
	7	1	$6,00 \times 10^5$	$6,60 \times 10^5 \pm 6,00 \times 10^4$	8
		2	$6,60 \times 10^5$		
		3	$7,20 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	8	1	$7,60 \times 10^5$	$7,13 \times 10^5 \pm 1,84 \times 10^5$	9
		2	$5,10 \times 10^5$		
		3	$8,70 \times 10^5$		
	9	1	$7,50 \times 10^5$	$9,80 \times 10^5 \pm 2,59 \times 10^5$	10
		2	$9,30 \times 10^5$		
		3	$1,26 \times 10^6$		
	10	1	$8,00 \times 10^5$	$1,27 \times 10^6 \pm 4,26 \times 10^5$	13
		2	$1,38 \times 10^6$		
		3	$1,63 \times 10^6$		
	11	1	$1,33 \times 10^6$	$1,33 \times 10^6 \pm 1,15 \times 10^5$	14
		2	$1,22 \times 10^6$		
		3	$1,45 \times 10^6$		
	12	1	$1,54 \times 10^6$	$1,37 \times 10^6 \pm 1,92 \times 10^5$	15
		2	$1,40 \times 10^6$		
		3	$1,16 \times 10^6$		
13	1	$9,90 \times 10^5$	$1,13 \times 10^6 \pm 1,24 \times 10^5$	16	
	2	$1,20 \times 10^6$			
	3	$1,21 \times 10^6$			
14	1	$1,20 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6 \pm 1,36 \times 10^5$	17	
	2	$9,40 \times 10^5$			
	3	$1,14 \times 10^6$			
15	1	$9,80 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6 \pm 3,46 \times 10^4$	21	
	2	$9,80 \times 10^5$			
	3	$1,04 \times 10^6$			

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	16	1	$1,03 \times 10^6$	$9,83 \times 10^5 \pm 4,16 \times 10^4$	22
		2	$9,50 \times 10^5$		
		3	$9,70 \times 10^5$		
	17	1	$1,07 \times 10^6$	$9,97 \times 10^5 \pm 1,45 \times 10^5$	23
		2	$8,30 \times 10^5$		
		3	$1,09 \times 10^6$		
3	1	1	$1,40 \times 10^5$	$1,47 \times 10^5 \pm 3,06 \times 10^4$	0
		2	$1,20 \times 10^5$		
		3	$1,80 \times 10^5$		
	2	1	$1,80 \times 10^5$	$1,80 \times 10^5 \pm 1,00 \times 10^4$	1
		2	$1,70 \times 10^5$		
		3	$1,90 \times 10^5$		
	3	1	$2,30 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5 \pm 3,00 \times 10^4$	2
		2	$1,70 \times 10^5$		
		3	$2,00 \times 10^5$		
	4	1	$2,70 \times 10^5$	$3,03 \times 10^5 \pm 3,06 \times 10^4$	3
		2	$3,10 \times 10^5$		
		3	$3,30 \times 10^5$		
	5	1	$2,10 \times 10^5$	$3,63 \times 10^5 \pm 1,33 \times 10^5$	6
		2	$4,30 \times 10^5$		
		3	$4,50 \times 10^5$		
	6	1	$6,20 \times 10^5$	$6,73 \times 10^5 \pm 5,03 \times 10^4$	7
		2	$7,20 \times 10^5$		
		3	$6,80 \times 10^5$		

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
2	7	1	$6,30 \times 10^5$	$6,67 \times 10^5 \pm 6,35 \times 10^4$	8
		2	$7,40 \times 10^5$		
		3	$6,30 \times 10^5$		
	8	1	$8,40 \times 10^5$	$7,90 \times 10^5 \pm 4,58 \times 10^4$	9
		2	$7,50 \times 10^5$		
		3	$7,80 \times 10^5$		
	9	1	$6,30 \times 10^5$	$8,97 \times 10^5 \pm 2,34 \times 10^5$	10
		2	$9,90 \times 10^5$		
		3	$1,07 \times 10^6$		
	10	1	$9,20 \times 10^5$	$1,14 \times 10^6 \pm 2,30 \times 10^5$	13
		2	$1,13 \times 10^6$		
		3	$1,38 \times 10^6$		
	11	1	$1,25 \times 10^6$	$1,11 \times 10^6 \pm 1,18 \times 10^5$	14
		2	$1,05 \times 10^6$		
		3	$1,04 \times 10^6$		
	12	1	$1,21 \times 10^6$	$1,22 \times 10^6 \pm 1,60 \times 10^5$	15
		2	$1,07 \times 10^6$		
		3	$1,39 \times 10^6$		
13	1	$1,16 \times 10^6$	$1,12 \times 10^6 \pm 4,00 \times 10^4$	16	
	2	$1,12 \times 10^6$			
	3	$1,08 \times 10^6$			
14	1	$1,03 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6 \pm 8,72 \times 10^4$	17	
	2	$1,19 \times 10^6$			
	3	$1,05 \times 10^6$			

Sistema	M	Rep	Concentración (cel/mL)	Promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
3	15	1	$1,11 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6 \pm 1,56 \times 10^5$	21
		2	$1,09 \times 10^6$		
		3	$8,30 \times 10^5$		
	16	1	$1,04 \times 10^6$	$1,01 \times 10^6 \pm 7,00 \times 10^4$	22
		2	$9,30 \times 10^5$		
		3	$1,06 \times 10^6$		
	17	1	$1,08 \times 10^6$	$1,05 \times 10^6 \pm 2,52 \times 10^4$	23
		2	$1,05 \times 10^6$		
		3	$1,03 \times 10^6$		

* M: muestra
Rep: repetición

Cuadro 19. Datos usados para la elaboración de la curva de crecimiento la microalga *H.pluvialis* basada en conteo celular, empleando una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$.

Concentración celular promedio (cel/mL)	Tiempo (días)
$1,50 \times 10^5 \pm 5,77 \times 10^3$	0
$1,81 \times 10^5 \pm 1,73 \times 10^3$	1
$2,03 \times 10^5 \pm 1,53 \times 10^4$	2
$2,70 \times 10^5 \pm 2,88 \times 10^4$	3
$3,67 \times 10^5 \pm 9,07 \times 10^3$	6
$5,20 \times 10^5 \pm 1,33 \times 10^5$	7
$6,30 \times 10^5 \pm 5,81 \times 10^4$	8
$7,00 \times 10^5 \pm 1,20 \times 10^5$	9
$8,47 \times 10^5 \pm 1,64 \times 10^5$	10
$1,21 \times 10^6 \pm 6,51 \times 10^4$	13
$1,18 \times 10^6 \pm 1,33 \times 10^5$	14
$1,25 \times 10^6 \pm 1,04 \times 10^5$	15
$1,16 \times 10^6 \pm 5,51 \times 10^4$	16
$1,04 \times 10^6 \pm 6,35 \times 10^4$	17
$1,13 \times 10^6 \pm 5,51 \times 10^4$	21
$1,01 \times 10^6 \pm 1,56 \times 10^4$	22
$1,02 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^4$	23

Anexo 5. Resultados obtenidos para la determinación de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de la fase exponencial de la microalga *H.pluvialis*.

Cuadro 20. Datos utilizados para la determinación de la tasa de crecimiento y tiempo de generación de la microalga *H.pluvialis*, comparando las tres curvas de crecimiento.

Curva	Tiempo (días)	Densidad Celular (cel/mL)	LN	μ (d ⁻¹)	Tg (d)
Condiciones iniciales (70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$)	2	2,03x10 ⁵	12,22	0,3	2,7
	3	2,16x10 ⁵	12,28		
	5	4,48x10 ⁵	13,01		
	6	6,57x10 ⁵	13,40		
	7	8,36x10 ⁵	13,64		
	8	1,11x10 ⁶	13,92		
	9	1,26x10 ⁶	14,05		
150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$	2	2,27x10 ⁵	12,33	0,2	3,9
	3	2,62x10 ⁵	12,48		
	4	3,08x10 ⁵	12,64		
	5	4,40x10 ⁵	12,99		
	7	5,15x10 ⁵	13,15		
	8	8,04x10 ⁵	13,60		
	9	7,94x10 ⁵	13,58		
200 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$	2	2,03x10 ⁵	12,22	0,2	3,9
	3	2,70x10 ⁵	12,51		
	6	3,67x10 ⁵	12,81		
	7	5,20x10 ⁵	13,16		
	8	6,30x10 ⁵	13,35		
	9	7,00x10 ⁵	13,46		
	10	8,47x10 ⁵	13,65		

* LN: logaritmo natural de la concentración

μ : tasa de crecimiento

Tg: tiempo de generación

Anexo 6. ANOVA de un solo factor para la determinación de las diferencias significativas entre las fases exponenciales de las curvas manteniendo condiciones iniciales similares.

Curva N Media Agrupación

70	5 725000 A
150	5 520400 A
200	5 464600 A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles Valores
Días	5 2; 3; 7; 8; 9

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Días	4	1,29893E+12	3,24732E+11	8,83	0,003
Error	10	3,67691E+11	36769133333		
Total	14	1,66662E+12			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
191753	77,94%	69,11%	50,36%

Medias

<u>Días</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Desv.Est.</u>	<u>IC de 95%</u>
2	3	211000	13856	(-35674; 457674)
3	3	249333	29143	(2659; 496007)
7	3	623667	183903	(376993; 870341)
8	3	848000	243006	(601326; 1094674)
9	3	918000	299887	(671326; 1164674)

Desv.Est. agrupada = 191753

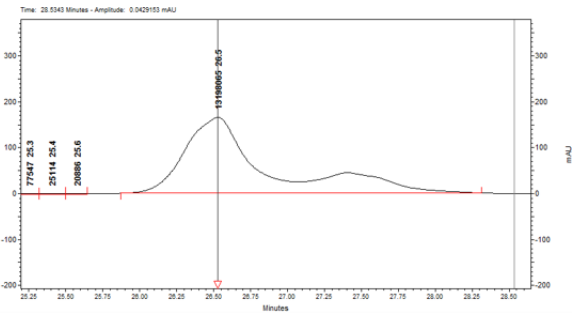
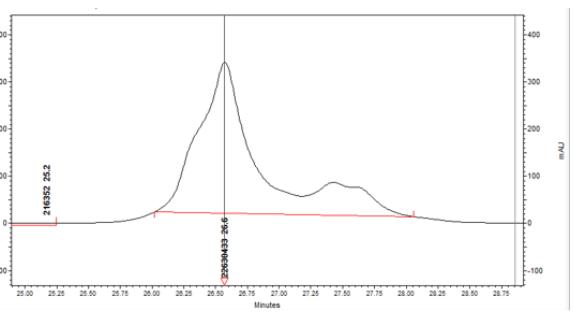
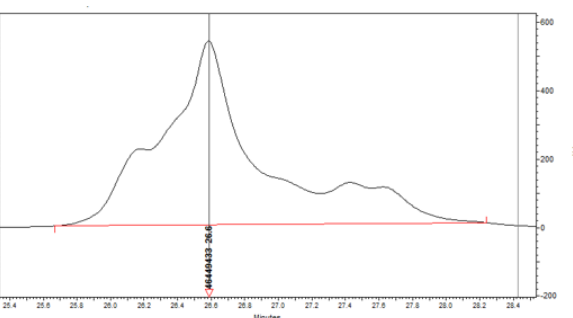
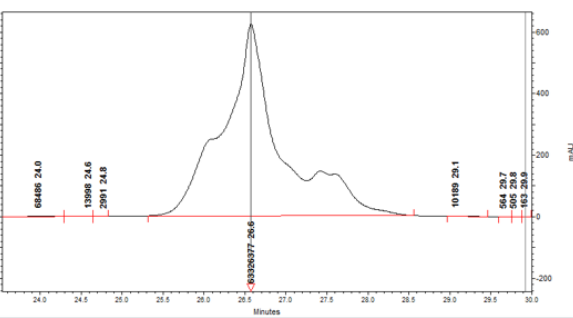
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

<u>Días</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
9	3	918000	A
8	3	848000	A
7	3	623667	A B
3	3	249333	B
2	3	211000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 7. Resultados obtenidos de la curva de calibración para determinar el contenido de astaxantina en las muestras analizadas en el HPLC.

Patrón	Cromatograma
P ₁	 <p>Time: 28.543 Minutes - Amplitude: 0.9429153 mAU</p> <p>Peak labels: 71547 25.3, 25114 25.4, 20896 25.6, 2198067 26.5</p>
P ₂	 <p>Peak labels: 21632 25.2, 2263943 26.6</p>
P ₃	 <p>Peak label: 4644833 26.6</p>
P ₄	 <p>Peak labels: 66488 24.0, 13982 24.6, 2091 24.8, 6332837 26.6, 10182 29.1, 564 29.7, 505 29.8, 183 29.9</p>

Cuadro 21. Relación de la concentración de los patrones de la curva de calibración de astaxantina con el área obtenida, empleando el método HPLC.

Patrón (nivel)	Concentración (mg/mL)	Área bajo la curva (mAU)
0	0	0
1	0,00669	13198065
2	0,01337	22630433
3	0,02006	46449433
4	0,02675	63326377

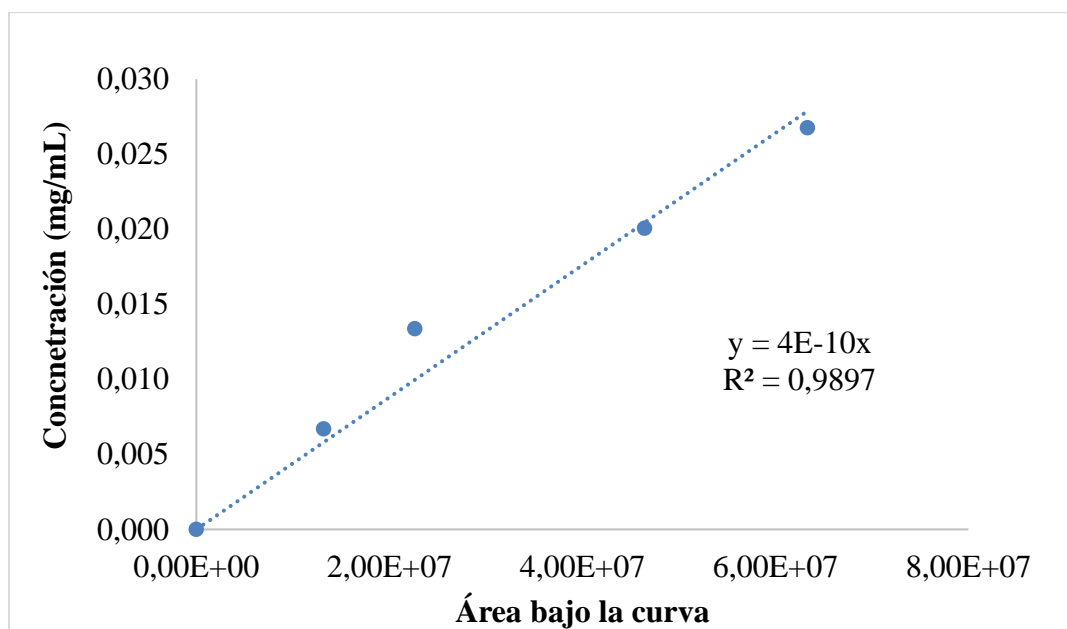
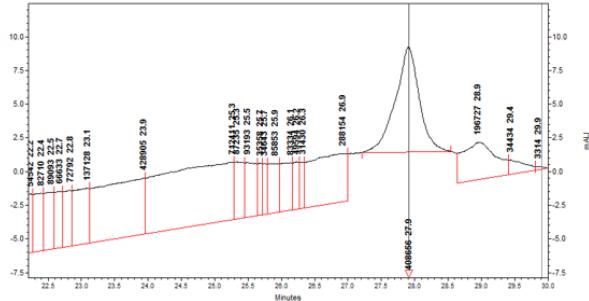
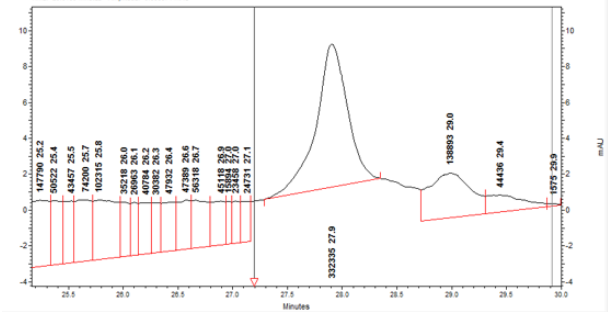
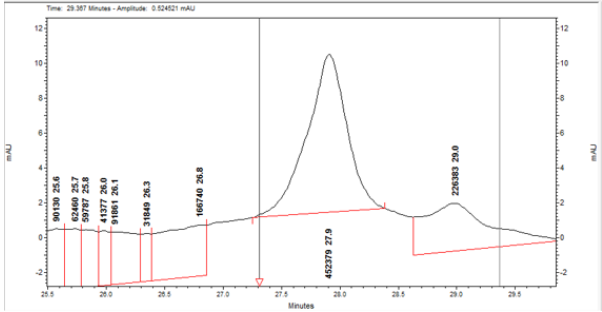
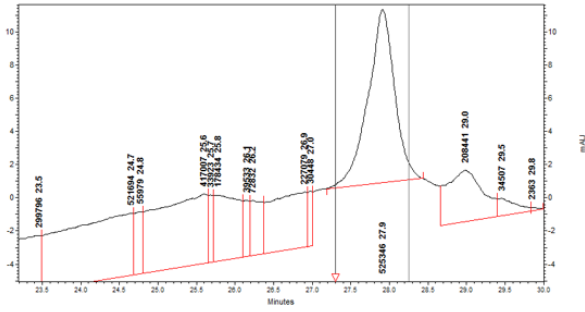
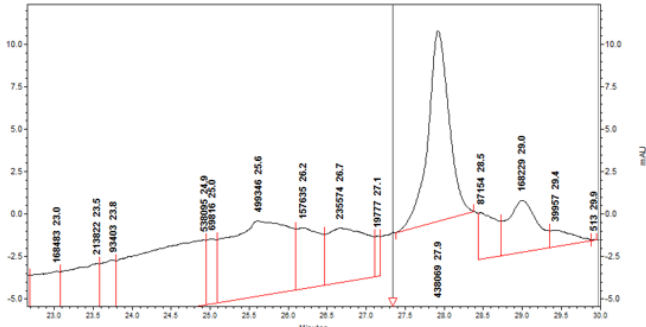
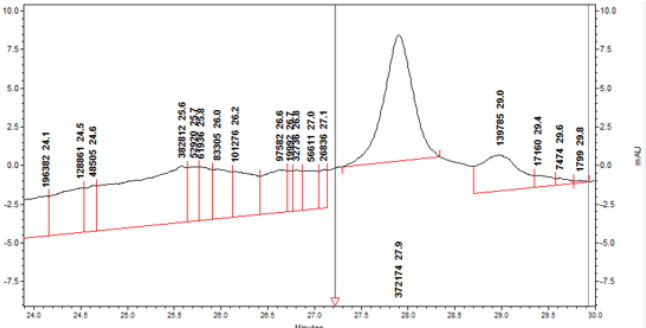
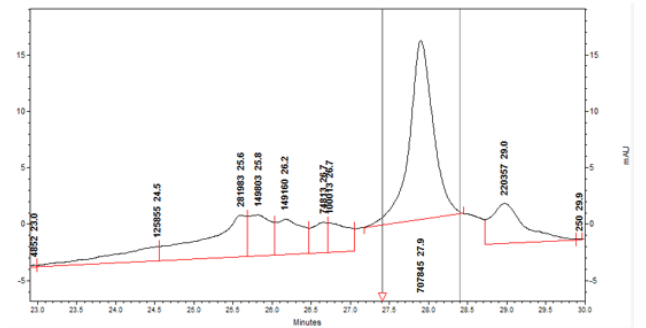
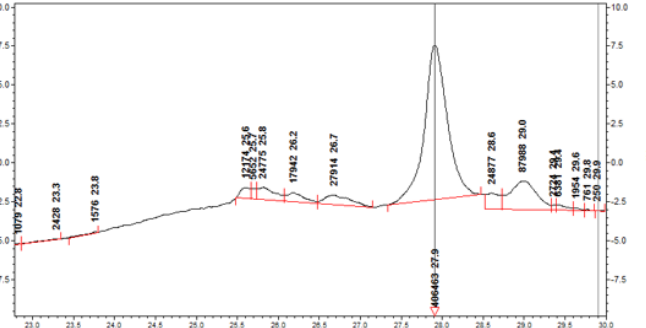
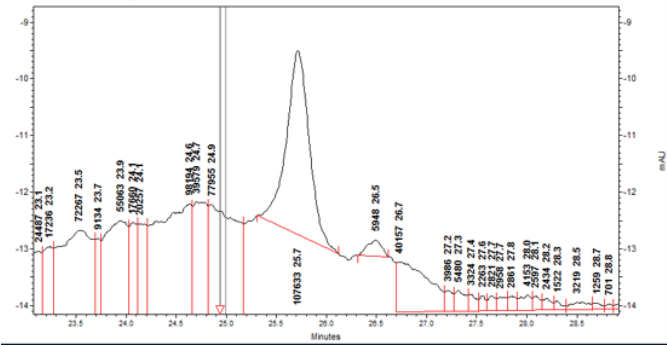
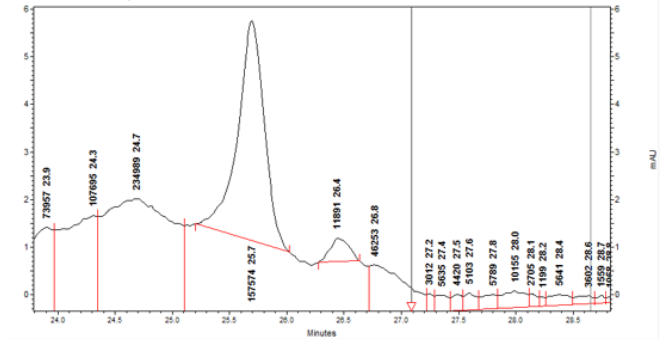
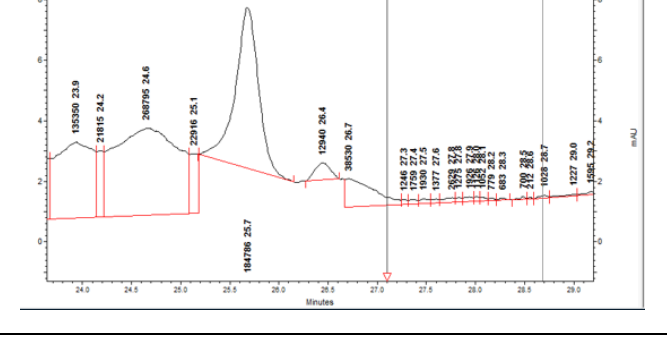
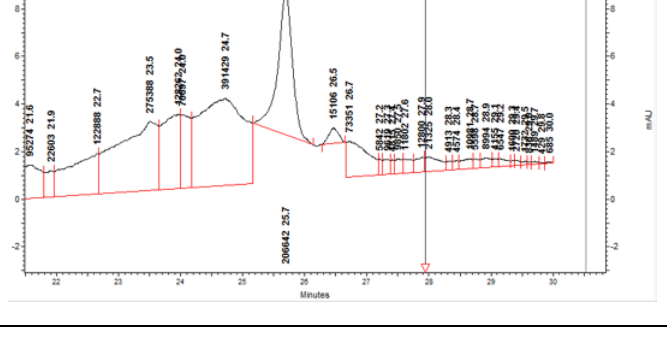


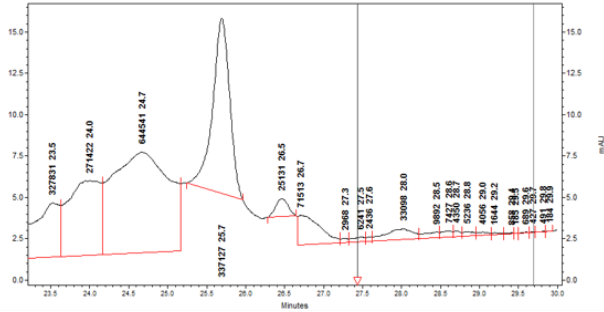
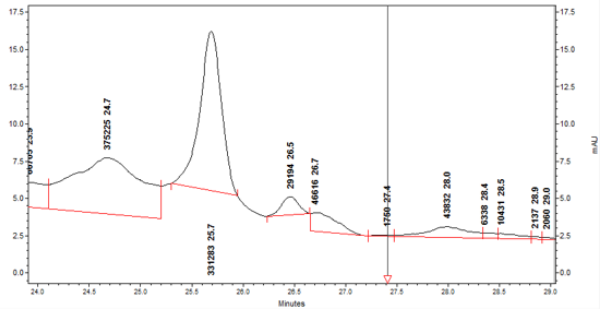
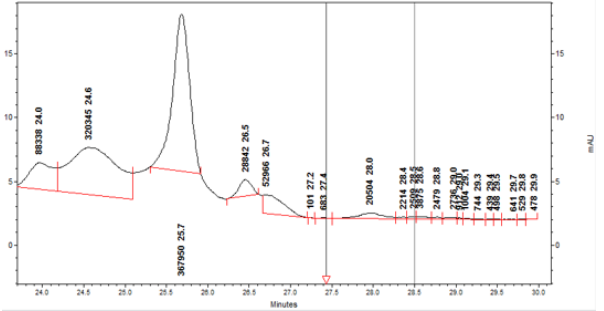
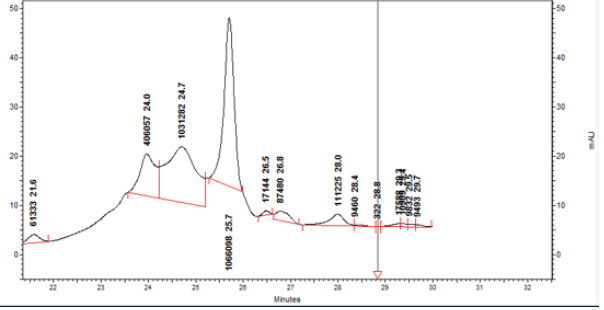
Figura 25. Curva de calibración utilizada para la determinación de las concentraciones de astaxantina durante los muestreos diarios a las diferentes intensidades de luz.

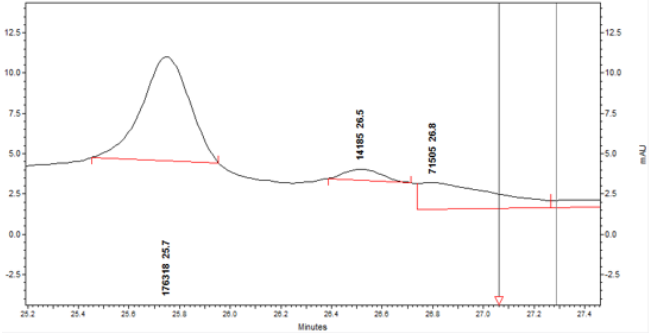
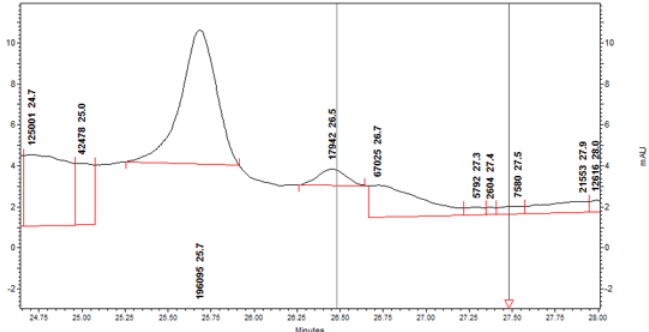
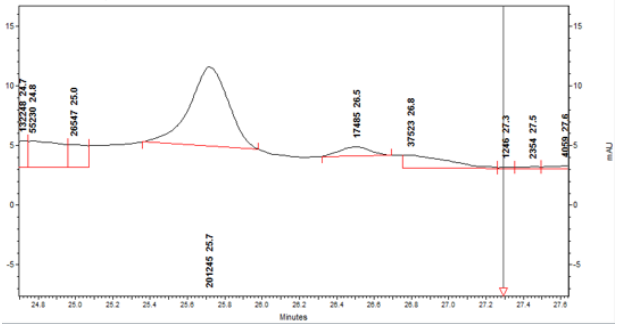
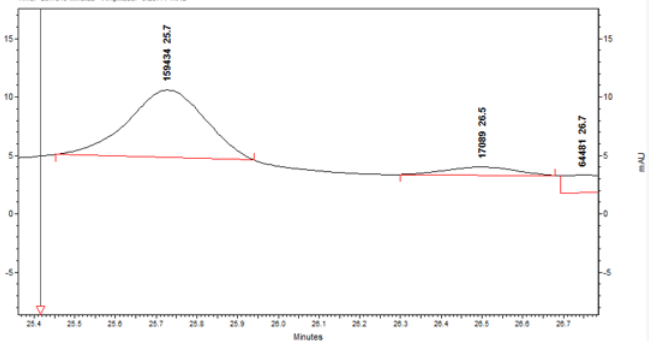
Anexo 8. Resultados obtenidos de las muestras diarias para determinar el contenido de astaxantina analizadas en el HPLC.

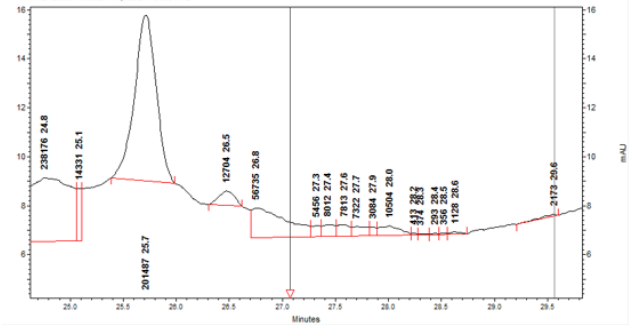
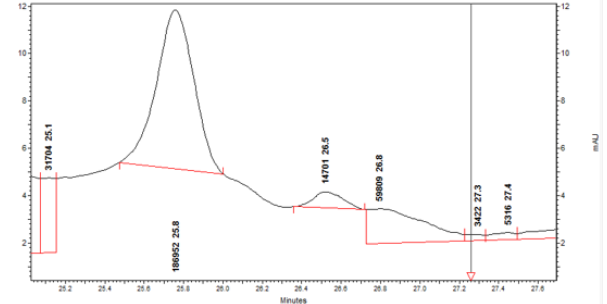
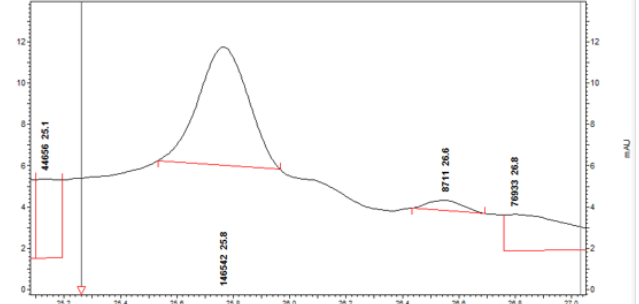
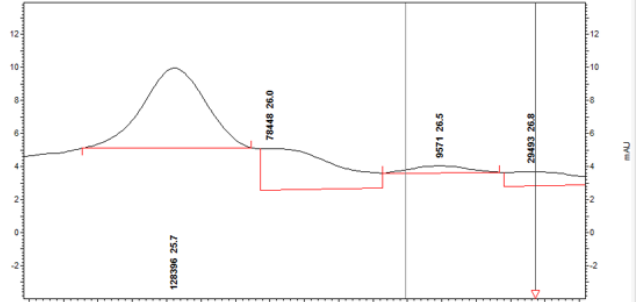
Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	9	 <p>Chromatogram for Day 9 showing a major peak at 27.9 minutes and a smaller peak at 29.4 minutes. The x-axis is labeled 'Minutes' and the y-axis is 'mAU'.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	10	 <p>Chromatogram for Day 10 showing a major peak at 27.9 minutes and a smaller peak at 29.4 minutes. The x-axis is labeled 'Minutes' and the y-axis is 'mAU'.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	14	 <p>Chromatogram for Day 14 showing a major peak at 27.9 minutes and a smaller peak at 29.0 minutes. The x-axis is labeled 'Minutes' and the y-axis is 'mAU'.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	15	 <p>Chromatogram for Day 15 showing a major peak at 27.9 minutes and a smaller peak at 29.0 minutes. The x-axis is labeled 'Minutes' and the y-axis is 'mAU'.</p>

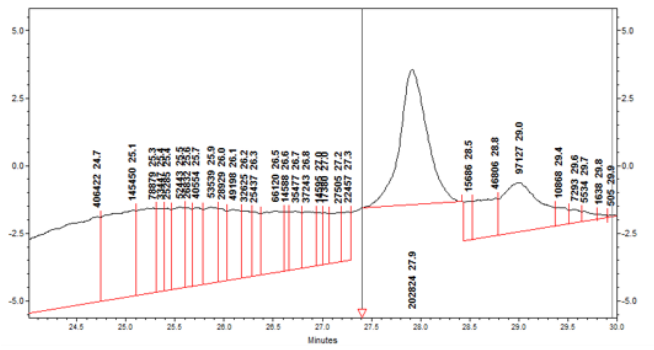
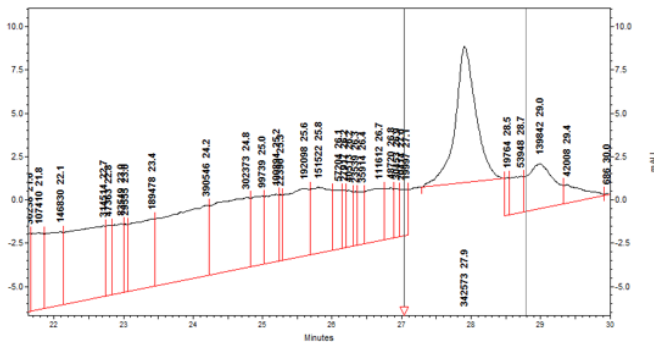
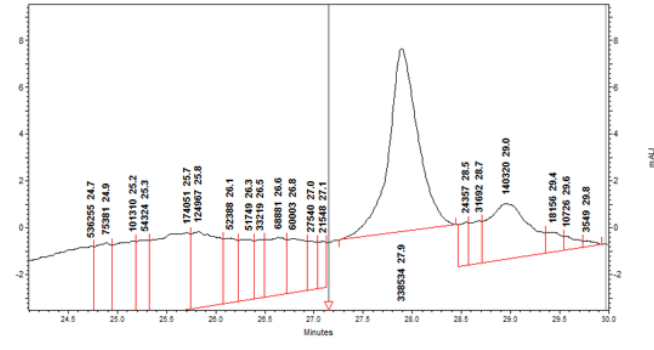
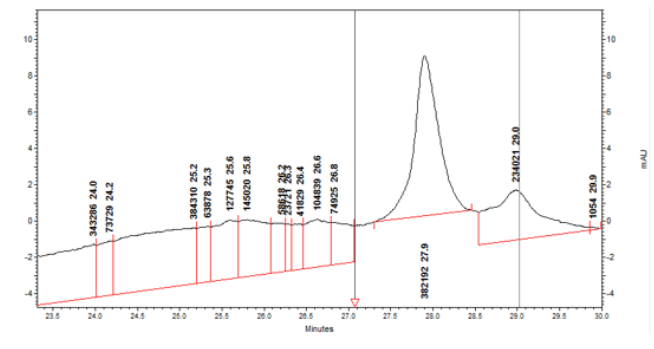
Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	17	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	21	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	23	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	24	

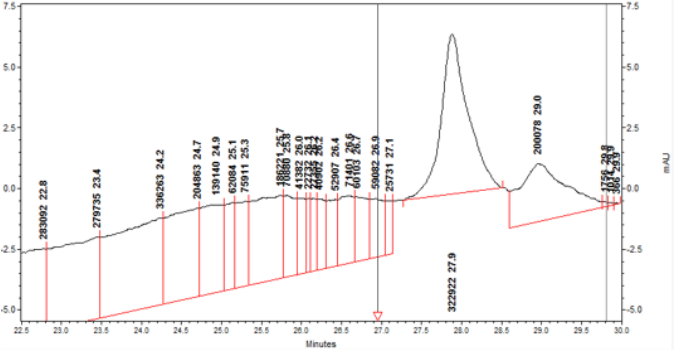
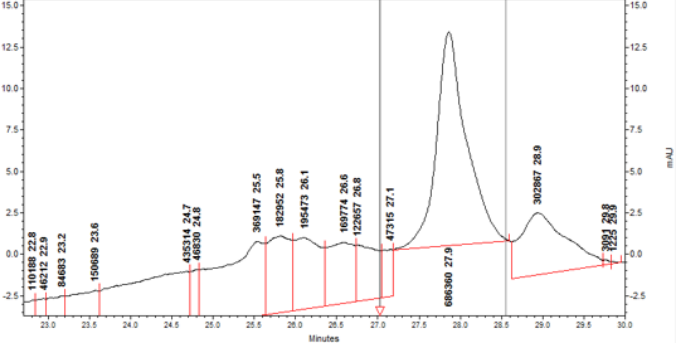
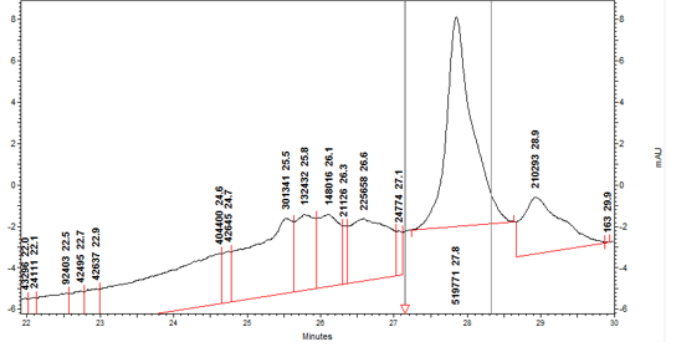
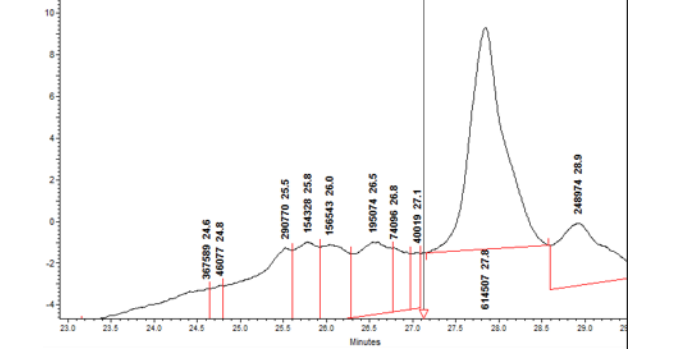
Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	9	 <p>Chromatogram for day 9. The x-axis represents time in minutes, ranging from approximately 23.5 to 28.5. The y-axis represents intensity in mAU, ranging from -14 to 0. A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Numerous other peaks are labeled with their retention times: 17286.23.2, 72267.23.5, 9134.23.7, 59063.23.9, 30269.24.1, 88194.24.5, 77855.24.9, 107633.25.7, 5948.26.5, 40157.26.7, 3986.27.2, 5480.27.3, 324.27.4, 2324.27.6, 2821.27.7, 2861.27.8, 10155.28.0, 4153.28.9, 2305.28.1, 1199.28.2, 2434.28.3, 1522.28.3, 3219.28.5, 1659.28.7, and 701.28.8.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	10	 <p>Chromatogram for day 10. The x-axis represents time in minutes, ranging from approximately 24.0 to 28.5. The y-axis represents intensity in mAU, ranging from 0 to 6. A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Numerous other peaks are labeled with their retention times: 73957.23.9, 107695.24.3, 234889.24.7, 197574.25.7, 11891.26.4, 46253.26.8, 3012.27.2, 5635.27.4, 4420.27.5, 5103.27.6, 5789.27.8, 10155.28.0, 2305.28.1, 1199.28.2, 5641.28.4, 3602.28.6, 1959.28.7, and 701.28.8.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	14	 <p>Chromatogram for day 14. The x-axis represents time in minutes, ranging from approximately 24.0 to 28.5. The y-axis represents intensity in mAU, ranging from 0 to 8. A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Numerous other peaks are labeled with their retention times: 135390.23.9, 21815.24.2, 268795.24.6, 22916.25.1, 184786.25.7, 12940.26.4, 36539.26.7, 1346.27.2, 1759.27.4, 1930.27.5, 2719.27.6, 3576.27.8, 4028.28.0, 4153.28.1, 778.28.2, 682.28.3, 2305.28.1, 1009.28.7, 1227.29.0, 1555.29.2, and 701.28.8.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	15	 <p>Chromatogram for day 15. The x-axis represents time in minutes, ranging from approximately 21.5 to 30.0. The y-axis represents intensity in mAU, ranging from -4 to 8. A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Numerous other peaks are labeled with their retention times: 92574.21.5, 22803.21.9, 122888.22.7, 275388.23.5, 162875.24.0, 391429.24.7, 306642.25.7, 15106.26.5, 73351.26.7, 6814.27.2, 1759.27.4, 1930.27.5, 11802.27.6, 34495.28.0, 4571.28.3, 3809.28.7, 4153.28.1, 1998.28.3, 1659.28.7, 1659.28.7, and 682.28.3.</p>

Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	17	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	21	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	23	
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	24	

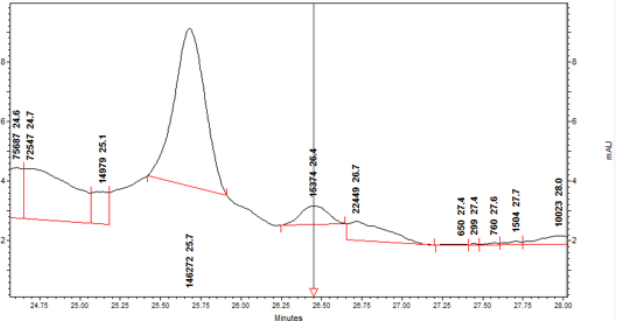
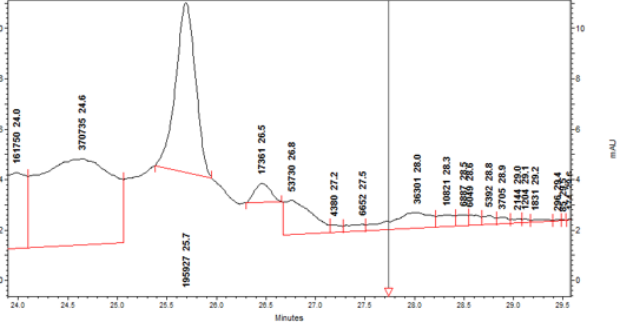
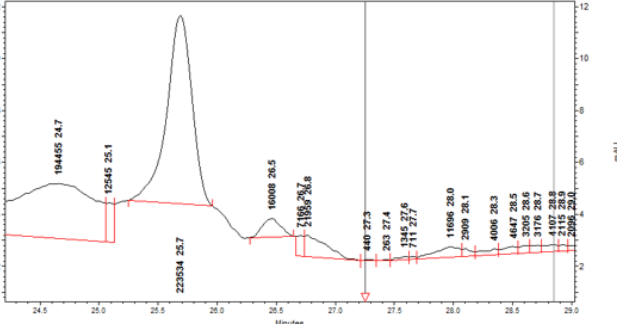
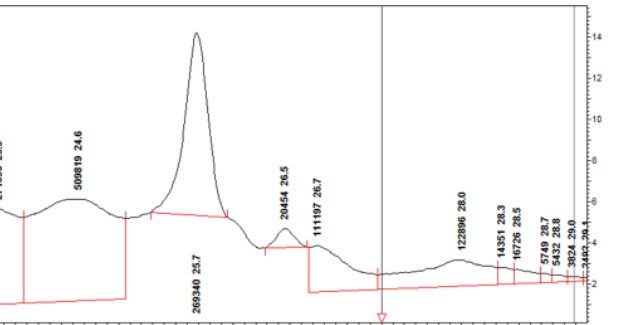
Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	9	 <p>Chromatogram for Day 9. The x-axis represents time in minutes (25.2 to 27.4), and the y-axis represents intensity in mAU (-2.5 to 12.5). The main peak is at 25.7 minutes. Other labeled peaks are at 26.5 and 26.8 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	10	 <p>Chromatogram for Day 10. The x-axis represents time in minutes (24.75 to 28.00), and the y-axis represents intensity in mAU (-5 to 10). The main peak is at 25.7 minutes. Other labeled peaks are at 26.5, 27.3, and 27.4 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	14	 <p>Chromatogram for Day 14. The x-axis represents time in minutes (24.8 to 27.6), and the y-axis represents intensity in mAU (-5 to 15). The main peak is at 25.7 minutes. Other labeled peaks are at 26.5, 26.8, 27.3, and 27.5 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	15	 <p>Chromatogram for Day 15. The x-axis represents time in minutes (25.4 to 26.7), and the y-axis represents intensity in mAU (-5 to 15). The main peak is at 25.7 minutes. Other labeled peaks are at 26.5 and 26.7 minutes.</p>

Sistema y curva	Día	Cromatograma
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	17	 <p>Chromatogram for Day 17 showing a large peak at 25.7 minutes and several smaller peaks at 24.8, 25.1, 26.5, 26.8, 27.3, 27.4, 27.6, 27.7, 27.9, 28.0, 28.2, 28.3, 28.4, 28.5, and 28.6 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	21	 <p>Chromatogram for Day 21 showing a large peak at 25.8 minutes and several smaller peaks at 25.1, 26.8, 26.5, 26.8, 27.3, and 27.4 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	23	 <p>Chromatogram for Day 23 showing a large peak at 25.8 minutes and several smaller peaks at 25.1, 26.8, 26.6, and 26.8 minutes.</p>
150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	24	 <p>Chromatogram for Day 24 showing a large peak at 25.7 minutes and several smaller peaks at 26.0, 26.5, and 26.8 minutes.</p>

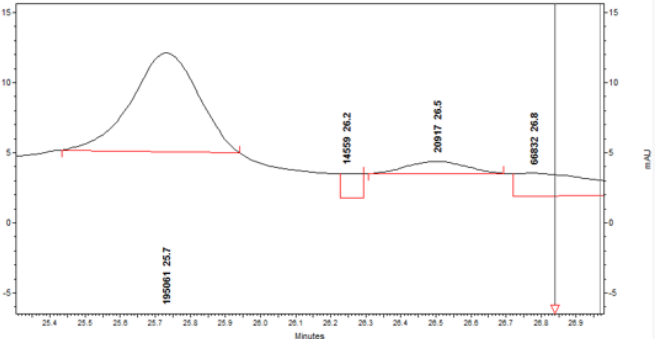
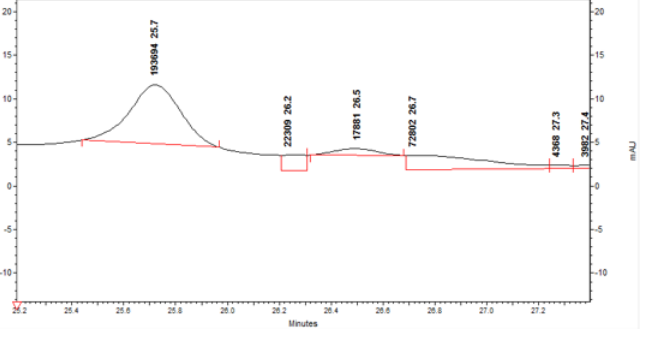
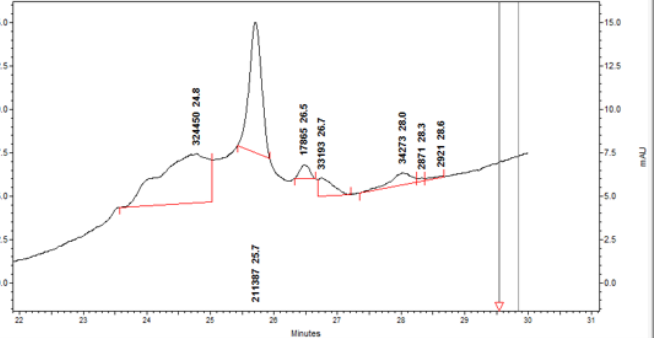
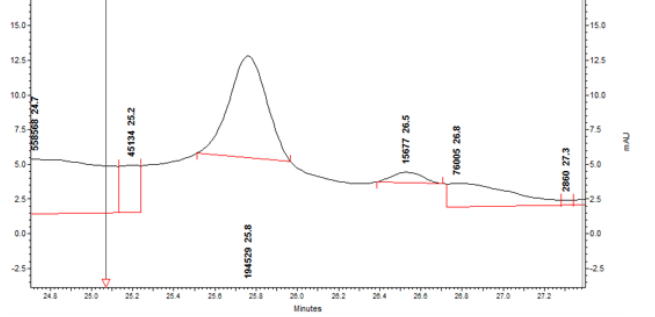
Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	10	 <p>Chromatogram for Day 10. The x-axis represents time in minutes (24.5 to 30.0) and the y-axis represents intensity in mAU (-5.0 to 5.0). A prominent peak is observed at 27.9 minutes. Numerous smaller peaks are labeled with their retention times: 406422 24.7, 145460 25.1, 23877 25.3, 25685 25.4, 26137 25.6, 26812 25.8, 28929 26.0, 53939 25.9, 49198 26.1, 25437 26.3, 66120 26.5, 14888 26.6, 27143 26.7, 37143 26.7, 14888 26.6, 27143 26.7, 24586 27.0, 27595 27.2, 22457 27.3, 203824 27.9, 15686 28.5, 46806 28.8, 97127 29.0, 10668 29.4, 7293 29.6, 5534 29.7, 8038 29.8, 29233 29.9.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	13	 <p>Chromatogram for Day 13. The x-axis represents time in minutes (21.5 to 30.0) and the y-axis represents intensity in mAU (-5.0 to 10.0). A prominent peak is observed at 27.9 minutes. Numerous smaller peaks are labeled with their retention times: 30229 21.8, 107410 21.8, 146830 22.1, 31551 22.7, 29548 23.0, 188478 23.4, 390546 24.2, 302373 24.8, 9738 25.0, 25981 25.2, 192098 25.6, 151522 25.8, 51204 26.2, 14213 26.3, 25514 26.3, 111612 26.7, 16677 27.1, 342573 27.9, 19764 28.5, 53946 28.7, 138842 29.0, 42088 29.4, 886 30.0.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	14	 <p>Chromatogram for Day 14. The x-axis represents time in minutes (24.5 to 30.0) and the y-axis represents intensity in mAU (-2 to 8). A prominent peak is observed at 27.9 minutes. Numerous smaller peaks are labeled with their retention times: 536255 24.7, 75381 24.9, 401810 25.2, 54324 25.3, 174851 25.7, 124867 25.8, 52388 26.1, 51748 26.3, 38219 26.5, 68881 26.6, 66865 26.8, 21540 27.0, 21540 27.0, 124867 27.1, 338634 27.9, 24357 28.5, 31892 28.7, 140320 29.0, 88196 29.4, 10726 29.6, 3549 29.8.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	15	 <p>Chromatogram for Day 15. The x-axis represents time in minutes (23.5 to 30.0) and the y-axis represents intensity in mAU (-4 to 10). A prominent peak is observed at 27.9 minutes. Numerous smaller peaks are labeled with their retention times: 343286 24.0, 73729 24.2, 384310 25.2, 63878 25.3, 127745 25.6, 145020 25.8, 28917 26.3, 41829 26.4, 104839 26.6, 74825 26.8, 385192 27.9, 234021 29.0, 1054 29.9.</p>

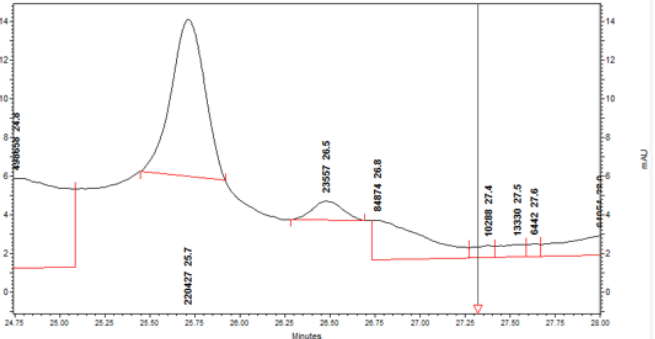
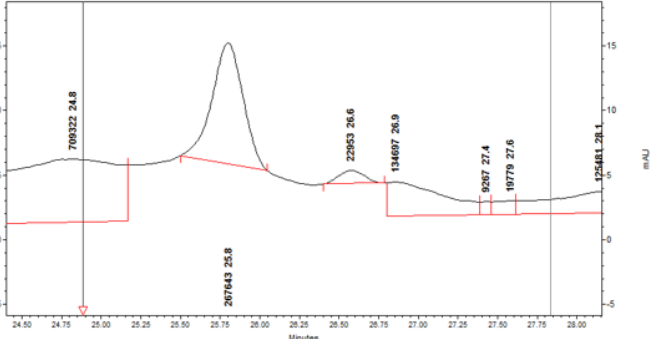
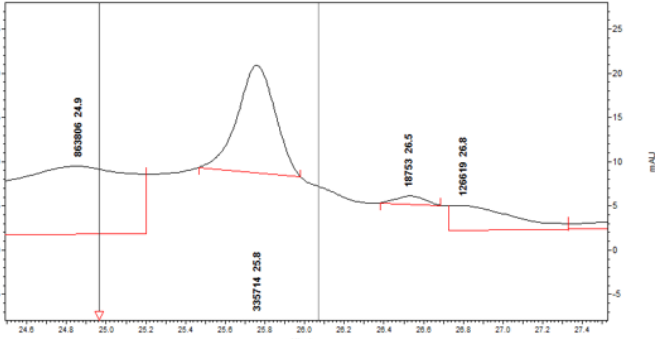
Sistema y curva	Día	Cromatograma																														
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	16	 <p>Chromatogram for day 16 showing a series of peaks from 22.8 to 27.1 minutes and a large peak at 27.9 minutes. The y-axis ranges from -5.0 to 7.5 mAU.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Retention Time (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>263002</td></tr> <tr><td>279735</td></tr> <tr><td>336259</td></tr> <tr><td>204863</td></tr> <tr><td>193140</td></tr> <tr><td>206871</td></tr> <tr><td>179111</td></tr> <tr><td>186621</td></tr> <tr><td>186621</td></tr> <tr><td>213323</td></tr> <tr><td>213323</td></tr> <tr><td>464852</td></tr> <tr><td>52907</td></tr> <tr><td>61001</td></tr> <tr><td>60983</td></tr> <tr><td>25731</td></tr> <tr><td>27.9</td></tr> <tr><td>200078</td></tr> <tr><td>29.0</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> </tbody> </table>	Retention Time (min)	263002	279735	336259	204863	193140	206871	179111	186621	186621	213323	213323	464852	52907	61001	60983	25731	27.9	200078	29.0	28.9	28.9	28.9							
Retention Time (min)																																
263002																																
279735																																
336259																																
204863																																
193140																																
206871																																
179111																																
186621																																
186621																																
213323																																
213323																																
464852																																
52907																																
61001																																
60983																																
25731																																
27.9																																
200078																																
29.0																																
28.9																																
28.9																																
28.9																																
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	17	 <p>Chromatogram for day 17 showing a series of peaks from 22.8 to 27.1 minutes and a large peak at 27.9 minutes. The y-axis ranges from -5.0 to 15.0 mAU.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Retention Time (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>110188</td></tr> <tr><td>46212</td></tr> <tr><td>84483</td></tr> <tr><td>150689</td></tr> <tr><td>150689</td></tr> <tr><td>45514</td></tr> <tr><td>45514</td></tr> <tr><td>46539</td></tr> <tr><td>46539</td></tr> <tr><td>369147</td></tr> <tr><td>182952</td></tr> <tr><td>182952</td></tr> <tr><td>195473</td></tr> <tr><td>195473</td></tr> <tr><td>160774</td></tr> <tr><td>160774</td></tr> <tr><td>122617</td></tr> <tr><td>122617</td></tr> <tr><td>47315</td></tr> <tr><td>47315</td></tr> <tr><td>27.9</td></tr> <tr><td>302617</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> </tbody> </table>	Retention Time (min)	110188	46212	84483	150689	150689	45514	45514	46539	46539	369147	182952	182952	195473	195473	160774	160774	122617	122617	47315	47315	27.9	302617	28.9	28.9	28.9				
Retention Time (min)																																
110188																																
46212																																
84483																																
150689																																
150689																																
45514																																
45514																																
46539																																
46539																																
369147																																
182952																																
182952																																
195473																																
195473																																
160774																																
160774																																
122617																																
122617																																
47315																																
47315																																
27.9																																
302617																																
28.9																																
28.9																																
28.9																																
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	21	 <p>Chromatogram for day 21 showing a series of peaks from 22.8 to 27.1 minutes and a large peak at 27.9 minutes. The y-axis ranges from -6 to 8 mAU.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Retention Time (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>24111</td></tr> <tr><td>24111</td></tr> <tr><td>92403</td></tr> <tr><td>92403</td></tr> <tr><td>42495</td></tr> <tr><td>42495</td></tr> <tr><td>42637</td></tr> <tr><td>42637</td></tr> <tr><td>40405</td></tr> <tr><td>40405</td></tr> <tr><td>40405</td></tr> <tr><td>40405</td></tr> <tr><td>301341</td></tr> <tr><td>132432</td></tr> <tr><td>132432</td></tr> <tr><td>148316</td></tr> <tr><td>148316</td></tr> <tr><td>21126</td></tr> <tr><td>21126</td></tr> <tr><td>225628</td></tr> <tr><td>225628</td></tr> <tr><td>24774</td></tr> <tr><td>24774</td></tr> <tr><td>27.9</td></tr> <tr><td>519771</td></tr> <tr><td>210293</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> </tbody> </table>	Retention Time (min)	24111	24111	92403	92403	42495	42495	42637	42637	40405	40405	40405	40405	301341	132432	132432	148316	148316	21126	21126	225628	225628	24774	24774	27.9	519771	210293	28.9	28.9	28.9
Retention Time (min)																																
24111																																
24111																																
92403																																
92403																																
42495																																
42495																																
42637																																
42637																																
40405																																
40405																																
40405																																
40405																																
301341																																
132432																																
132432																																
148316																																
148316																																
21126																																
21126																																
225628																																
225628																																
24774																																
24774																																
27.9																																
519771																																
210293																																
28.9																																
28.9																																
28.9																																
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	22	 <p>Chromatogram for day 22 showing a series of peaks from 24.6 to 27.1 minutes and a large peak at 27.9 minutes. The y-axis ranges from -4 to 10 mAU.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Retention Time (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>367589</td></tr> <tr><td>367589</td></tr> <tr><td>46077</td></tr> <tr><td>46077</td></tr> <tr><td>290770</td></tr> <tr><td>290770</td></tr> <tr><td>154329</td></tr> <tr><td>154329</td></tr> <tr><td>156542</td></tr> <tr><td>156542</td></tr> <tr><td>196974</td></tr> <tr><td>196974</td></tr> <tr><td>74896</td></tr> <tr><td>74896</td></tr> <tr><td>40019</td></tr> <tr><td>40019</td></tr> <tr><td>27.9</td></tr> <tr><td>614607</td></tr> <tr><td>248974</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> <tr><td>28.9</td></tr> </tbody> </table>	Retention Time (min)	367589	367589	46077	46077	290770	290770	154329	154329	156542	156542	196974	196974	74896	74896	40019	40019	27.9	614607	248974	28.9	28.9	28.9							
Retention Time (min)																																
367589																																
367589																																
46077																																
46077																																
290770																																
290770																																
154329																																
154329																																
156542																																
156542																																
196974																																
196974																																
74896																																
74896																																
40019																																
40019																																
27.9																																
614607																																
248974																																
28.9																																
28.9																																
28.9																																

Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 1	23	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	10	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	13	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	14	

Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	15	 <p>Chromatogram for day 15. The x-axis represents time in minutes (24.75 to 28.0) and the y-axis represents intensity in mAU (0 to 8). A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Other labeled peaks include 24.6, 24.7, 25.1, 26.4, 26.7, 27.4, 27.6, 27.7, and 28.0 minutes.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	16	 <p>Chromatogram for day 16. The x-axis represents time in minutes (24.0 to 29.5) and the y-axis represents intensity in mAU (0 to 10). A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Other labeled peaks include 24.0, 24.6, 25.1, 26.5, 26.8, 27.2, 27.5, 28.0, 28.3, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 29.0, 29.1, 29.2, 29.3, 29.4, and 29.5 minutes.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	17	 <p>Chromatogram for day 17. The x-axis represents time in minutes (24.5 to 29.0) and the y-axis represents intensity in mAU (0 to 12). A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Other labeled peaks include 24.7, 25.1, 26.5, 26.8, 27.3, 27.4, 27.6, 27.7, 28.0, 28.3, 28.5, 28.6, 28.7, 28.8, 29.0, and 29.1 minutes.</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	21	 <p>Chromatogram for day 21. The x-axis represents time in minutes (24.0 to 29.0) and the y-axis represents intensity in mAU (0 to 14). A prominent peak is observed at 25.7 minutes. Other labeled peaks include 23.9, 24.6, 26.5, 26.7, 28.0, 28.3, 28.5, 28.7, 28.8, 29.0, and 29.1 minutes.</p>

Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	22	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 2	23	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	10	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	13	

Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	14	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	15	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	16	
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	17	

Sistema y curva	Día	Cromatograma
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	21	 <p>Chromatogram for Day 21 showing a large peak at 25.7 minutes and several smaller peaks at 26.5, 26.8, 27.4, 27.5, and 27.6 minutes. The y-axis is mAU (0-14) and the x-axis is Minutes (24.75-28.00).</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	22	 <p>Chromatogram for Day 22 showing a large peak at 25.8 minutes and several smaller peaks at 24.8, 26.6, 26.9, 27.4, 27.6, and 28.1 minutes. The y-axis is mAU (-5 to 15) and the x-axis is Minutes (24.00-28.00).</p>
200 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ Sistema 3	23	 <p>Chromatogram for Day 23 showing a large peak at 25.8 minutes and several smaller peaks at 24.9, 26.5, and 26.8 minutes. The y-axis is mAU (-5 to 25) and the x-axis is Minutes (24.8-27.4).</p>

Cuadro 22. Datos utilizados para la determinación de la concentración de astaxantina expresada como $\mu\text{g/mL}$ obtenidos durante el muestreo diario utilizando las dos intensidades lumínicas como factor de estrés.

Curva	M	Sist	Área (mAU)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio ($\mu\text{g/mL}$)	Biomasa ($\pm 0,001\text{mg}$)	μg de Astaxantina por mg Biomasa	Promedio	Tiempo (días)
150 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}$	D9	1	408656	1,63	1,56 \pm 0,06	1,042	0,782	0,674 \pm 0,096	9
		2	107633	1,51		1,258	0,598		
		3	176318	1,53		1,197	0,641		
	D10	1	332335	1,60	1,56 \pm 0,04	1,415	0,565	0,565 \pm 0,004	10
		2	157574	1,53		1,341	0,569		
		3	196095	1,54		1,373	0,562		
	D11	1	452379	1,65	1,58 \pm 0,06	1,659	0,496	0,467 \pm 0,034	14
		2	184786	1,54		1,615	0,476		
		3	201245	1,54		1,799	0,429		
	D12	1	525346	1,68	1,58 \pm 0,08	1,602	0,523	0,456 \pm 0,060	15
		2	206642	1,55		1,881	0,411		
		3	159434	1,53		1,764	0,433		
	D14	1	438069	1,64	1,59 \pm 0,05	2,142	0,383	0,355 \pm 0,035	17
		2	337127	1,60		2,535	0,316		
		3	201484	1,54		2,105	0,367		
	D15	1	372174	1,61	1,58 \pm 0,04	1,653	0,488	0,391 \pm 0,095	21
		2	331283	1,60		2,680	0,298		
		3	186952	1,54		1,983	0,388		
	D16	1	707845	1,75	1,63 \pm 0,12	2,820	0,311	0,303 \pm 0,023	23
		2	367950	1,61		2,906	0,277		
		3	146542	1,52		2,371	0,321		

Curva	M	Sist	Área (mAU)	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	Biomasa (±0,001mg)	µg de Astaxantina por mg Biomasa	Promedio	Tiempo (días)
150 µmol/m ² s	D17	1	406463	1,63	1,68±0,20	2,913	0,279	0,258±0,147	24
		2	1066098	1,90		9,326	0,102		
		3	128396	1,51		1,927	0,393		
200 µmol/m ² s	D9	1	202824	1,54	1,54±0,04	1,237	0,624	0,636±0,019	10
		2	306197	1,59		1,206	0,658		
		3	86306	1,50		1,198	0,625		
	D10	1	342573	1,60	1,56±0,04	1,384	0,579	0,573±0,052	13
		2	246819	1,56		1,255	0,623		
		3	146340	1,52		1,466	0,519		
	D11	1	338534	1,60	1,56±0,03	1,912	0,418	0,455±0,023	14
		2	192834	1,54		1,685	0,457		
		3	195061	1,54		1,680	0,459		
	D12	1	382192	1,62	1,56±0,05	1,888	0,429	0,482±0,053	15
		2	146272	1,52		1,581	0,481		
		3	193694	1,54		1,439	0,535		
	D14	1	322922	1,59	1,56±0,03	1,845	0,432	0,382±0,076	16
		2	195927	1,54		1,833	0,421		
		3	211387	1,55		2,628	0,295		
	D15	1	686360	1,74	1,61±0,11	2,586	0,337	0,328±0,022	17
		2	223534	1,55		2,250	0,345		
		3	194529	1,54		2,542	0,303		
	D16	1	519771	1,67	1,60±0,07	2,644	0,317	0,363±0,041	21
		2	269340	1,57		2,075	0,379		
		3	220427	1,55		1,971	0,394		

Curva	M	Sist	Área (mAU)	Concentración (µg/mL)	Promedio (µg/mL)	Biomasa (±0,001mg)	µg de Astaxantina por mg Biomasa	Promedio	Tiempo (días)
200 µmol/m ² s	D17	1	614507	1,71	1,62±0,08	3,642	0,235	0,293±0,051	22
		2	270307	1,57		2,504	0,314		
		3	267643	1,57		2,373	0,331		
	D18	1	978918	1,86	1,69±0,15	4,416	0,211	0,251±0,064	23
		2	347575	1,60		2,469	0,325		
		3	335714	1,60		3,683	0,217		

* M: Muestra
Sist: Sistema

Anexo 9. Datos necesarios para la obtención de la actividad antioxidante mediante el método DPPH y ORAC.

Cuadro 23. Relación de la concentración de los patrones de Trolox de la curva de calibración con el % de inhibición, empleando el método DPPH.

Patrón (nivel)	Concentración (µM)	% Inhibición DPPH
P ₀	0	1,349
P ₁	72,556	15,645
P ₂	155,63	30,019
P ₃	228,19	43,738
P ₄	300,75	57,187
P ₅	362,8	71,676

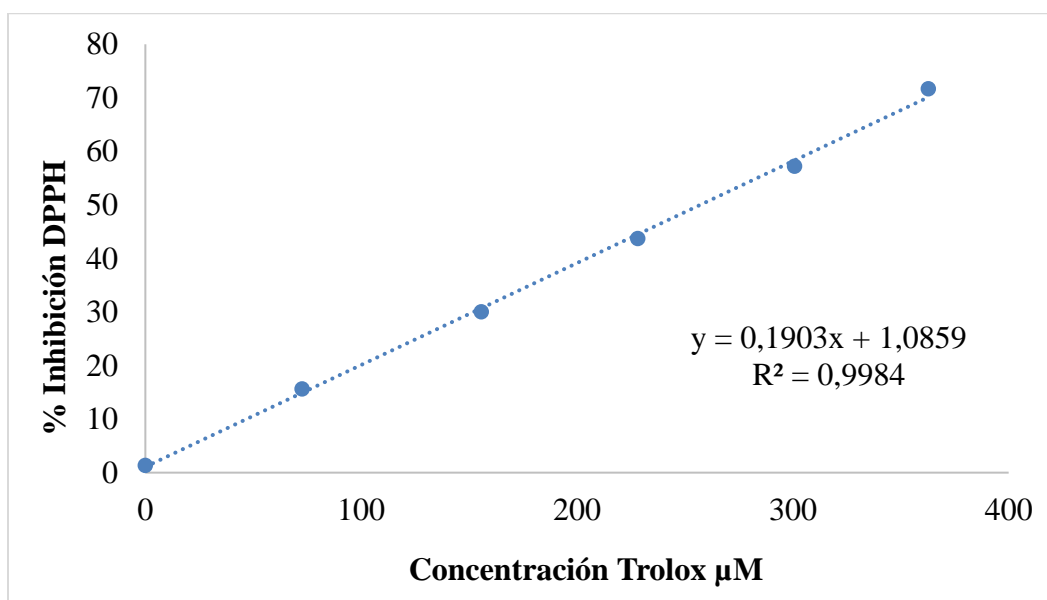


Figura 26. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, empleando el método DPPH.

Cuadro 24. Resultados obtenidos para determinar la actividad antioxidante empleando el método DPPH.

Muestra	Repetición	DPPH Valor Q
C ₁	1	-67,283
	2	-77,225
	3	-76,416
C _{1.1}	1	-40,694
	2	-41,850
	3	-40,809
C ₂	1	-151,214
	2	-150,405
	3	-150,867
C _{2.1}	1	-64,046
	2	-76,416
	3	-64,277
C _{2.2}	1	-32,254
	2	-39,306
	3	-36,647
C ₃	1	-151,445
	2	-154,104
	3	-152,948
C _{3.1}	1	-72,601
	2	-71,908
	3	-69,133
C _{3.2}	1	-36,069
	2	-37,457
	3	-34,220

* No concluyente

Cuadro 25. Relación de la concentración de los patrones de Trolox de la curva de calibración con el área bajo la curva, empleando el método ORAC.

Patrón (nivel)	Concentración (μM)	Net Área bajo la curva (AUC)
P ₀	0	0,797
P ₁	6,25	5,143
P ₂	12,5	9,781
P ₃	25	28,212
P ₄	50	48,295
P ₅	75	79,259
P ₆	100	97,265

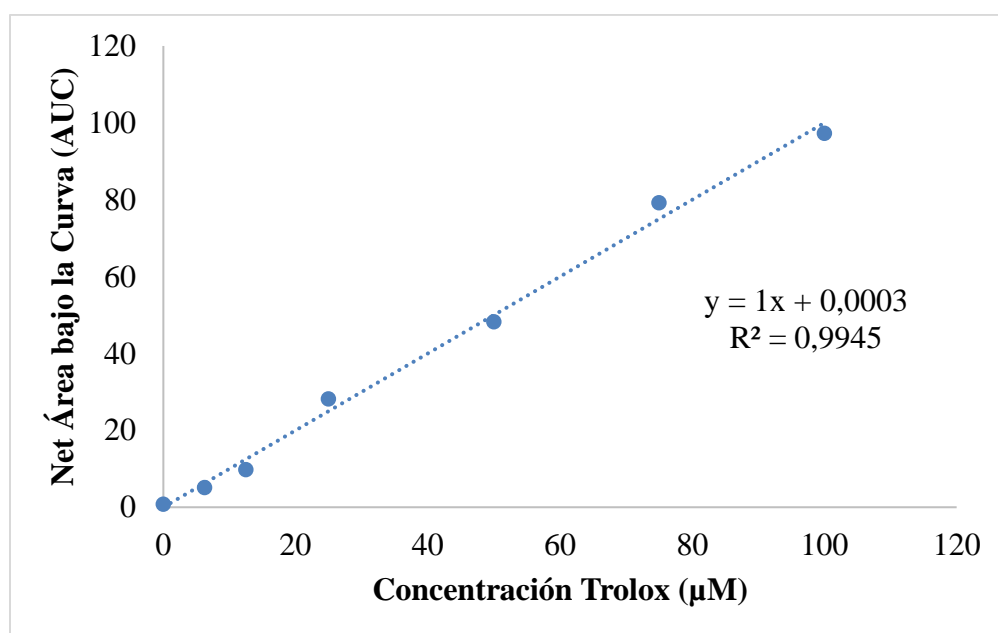


Figura 27. Curva de calibración para la determinación de la actividad antioxidante, empleando el método ORAC.

Cuadro 26. Resultados obtenidos para determinar la actividad antioxidante empleando el método ORAC.

Muestra	C ₁ -E ₁			C ₁ -E ₂			C ₁ -E ₃		
Repetición	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NET AUC	12,750	12,279	12,750	11,667	12,410	11,790	12,436	12,726	12,001
Concentración (μM)	65,933	63,563	65,930	60,484	64,220	61,106	64,352	65,810	62,165
Promedio (μM)	65,142			62,663			64,109		
FD (750/50)	977,130			939,945			961,635		
Masa (g)	0,010001			0,010014			0,010047		
μmol ET/g MS	97,7			93,9			95,7		
Promedio	95,8								
Desviación estándar	1,9								
% error	1,8								

Muestra	C ₂ -E ₁			C ₂ -E ₂			C ₂ -E ₃		
Repetición	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NET AUC	11,602	11,998	12,649	13,444	12,663	12,108	11,495	10,869	12,437
Concentración (µM)	60,157	62,153	65,425	69,421	65,493	62,704	59,620	56,609	64,361
Promedio (µM)	62,578			64,099			61,991		
FD (750/50)	938,675			961,478			929,858		
Masa (g)	0,010026			0,010011			0,010025		
µmol ET/g MS	93,6			96,0			92,8		
Promedio	94,1								
Desviación estándar	1,7								
% error	1,6								

Muestra	C ₃ -E ₁			C ₃ -E ₂			C ₃ -E ₃		
Repetición	1	2	3	1	2	3	1	2	3
NET AUC	10,749	9,177	9,331	7,600	8,650	9,695	10,036	9,890	7,713
Concentración (µM)	55,869	47,967	48,739	40,036	45,316	50,568	52,283	51,550	40,605
Promedio (µM)	48,353			47,942			48,146		
FD (750/50)	725,295			719,130			722,190		
Masa (g)	0,010029			0,010015			0,010071		
µmol ET/g MS	72,3			71,8			71,7		
Promedio	71,9								
Desviación estándar	0,3								
% error	0,2								