UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

” IDENTIFICACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE INTERÉS COMERCIAL EN MICROALGAS FLOCULANTES NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO”

POR

EDWIN ALEXIS FARIZ SALINAS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

JULIO, 2019

IDENTIFICACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE INTERÉS COMERCIAL EN MICROALGAS FLOCULANTES NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

Revisión de tesis

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Director de Tesis

Dr. Guillermo Cristian Guadalupe Martínez Ávila
Codirector de Tesis

Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado
Comité Tutorial

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo
Comité Tutorial

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Comité Tutorial

Agradecimientos

A través de estos párrafos quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que con su aporte científico y humano han colaborado en la realización de este proyecto de investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible esta investigación, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada, a la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por la oportunidad de estudiar la maestría, a la Facultad de Agronomía (FA) de la UANL y al Instituto Tecnológico de Nuevo León, por brindar la facilidad de utilizar sus equipos e instalaciones para el desarrollo de los objetivos específicos en esta investigación.

A mi asesor el Dr. Ulrico Javier López Chuken, por la acertada orientación, el apoyo y la discusión crítica que permitió un buen desarrollo y aprovechamiento para la realización de este proyecto, pero sobre todo por la confianza.

A mi co-asesor, Dr. Cristian Martínez Ávila, por la orientación y el apoyo, a mi comité tutorial por la orientación y cuestionamientos para mejorar este trabajo.

A Whitney, por su amistad y el apoyo brindado durante el desarrollo de la etapa de experimentación. A Franco, Habbi y Mayra por su gran amistad y compañerismo, por hacer más amena esta experiencia.

A mis amigos, mi familia Veracruzana, por ser un gran apoyo lejos de casa los quiero mucho chicos. A Martha, Valench, Yisus, Michi y Corpi por las palabras de apoyo y escuchar mis problemas cuando las cosas no salían y quería mandar todo… muy lejos.

Finalmente, agradezco a mi familia por su compresión, comunicación constante y apoyo desde lejos, para no decaer y continuar siempre, porque este era un sueño que hoy se hizo realidad.

Dedicatoria:

A mis queridos padres, Ramiro y Evangelina, gracias a ellos y a su apoyo incondicional,
he llegado a ser el profesional que soy ahora.
A mis hermanos y cuñadas, por estar ahí siempre al pie del cañón.
A Ximena, Ramiro y Erick de Jesús, por ser una gran inspiración,
motivándome a ser mejor día con día y a contribuir a mejorar el mundo para ustedes.

RESUMEN

Nombre: I.A. Edwin Alexis Fariz Salinas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: "IDENTIFICACIÓN DE BIOPRODUCTOS DE INTERÉS COMERCIAL EN MICROALGAS FLOCULANTES NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO"

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias
con orientación en Microbiología aplicada

Área de Estudio: Procesos Microbiológicos y
Biotecnología Ambiental Aplicada

Propósito y Método del Estudio: Las microalgas son microorganismos muy versátiles, capaces de aprovechar los nutrientes de aguas residuales, causantes de problemas tales como la eutrofización. Asociado a esto tienen la habilidad de sintetizar productos de interés comerciales de alto valor (PCAV) tales como; proteínas, ácidos grasos, precursores de vitaminas, carotenoides entre otros. Sin embargo, para acumular cantidades importantes de estos productos es necesario inducir a las células a estrés ambiental. Esta investigación tuvo como objetivo la identificación de PCAV en la biomasa del consorcio de microalgas BR-UANL-01 nativo del estado de Nuevo León, siguiendo las bases de la economía circular propuesta por la ONU, en los Objetivos del Desarrollo Sostenible para 2030.

Contribuciones y Conclusiones: El consorcio BR-UANL-01 fue reactivado en agua residual tratada, la cual sirvió como medio de crecimiento, durante la reactivación el pH fue monitoreado. Además, se lograron identificar por claves taxonómicas dos géneros de microalgas (*Scenedesmus spp.* y *Chlorella spp.*) y dos géneros de cianobacterias (*Microcystis spp,* y *Leptolyngbya spp.*) predominantes. Posteriormente el consorcio fue sometido a dos tipos de estrés en el medio de crecimiento; salino y por exceso de fotones ambos tipos de estrés generan estrés oxidativo en las células, con la finalidad de incrementar la concentración de luteína en el interior de las células. Durante esta etapa el pH y [PO_4^{3-}] fueron monitoreados, con base a los resultados obtenidos se eligió el lote 1 correspondiente al estrés por exceso de fotones para continuar con la experimentación. Se realizaron dos métodos para la extracción de luteína de las células de dicho consorcio, las cuales fueron: extracción sólido-líquido y extracción asistida con ultrasonido. Posteriormente se realizó la identificación de luteína a través de HPLC (Young Lin YL9300) con detector UV. Se analizó tanto la biomasa no estresada que sirvió de control, así como la biomasa estresada, con base en los resultados obtenidos la mayor concentración de luteína se registró en las células no estresadas del consorcio BR-UANL-01, a través de la extracción sólido-líquido obtenido aproximadamente 2.91 mg/g (BS) de luteína, posteriormente se realizó el análisis de la actividad antioxidante por el método $ABTS^{\circ+}$ de los extractos obtenidos, registrando un 51% de inhibición de equivalente de trolox por gramo de peso seco del extracto de biomasa no estresada por extracción sólido-líquido. El consorcio BR-UANL-01, fue capaz de sintetizar y acumular cantidades significativas de luteína intracelular naturalmente sin la necesidad inducir al estrés oxidativo, lo cual representa una ventaja dado el ahorro económico y el beneficio ambiental de no tener que modificar el efluente secundario utilizado como medio de cultivo.

Asesor: Dr. Ulrico J. López Chuken: _____

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

°C	Grados Celsius
$ABTS^{\bullet+}$	Radical ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico)
ANOVA	Análisis de Varianza
BKT	β-caroteno Desaturasa
BS	Base Seca
Ca	Calcio
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de Carbono
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
$DPPH^{\bullet}$	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EST	Efluente Secundario Tratado
Fe	Hierro
FRAP	Poder Antioxidante Reductor del Hierro
g	Gramos
GGPP	Geranil-geranil difosfato
h	Horas
H	Hidrógeno
HCO_3^-	Bicarbonato
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
K	Potasio
$K_2S_2O_8$	Persulfato de Potasio
L	Litro
m^3/hab/año	Metro cúbico por habitante por año
MDD	Millones de Dólares
MEC	Modelo Económico Circular
MEL	Modelo Económico Lineal
Mg	Magnesio
mg GAE g^{-1}	Equivalente de Ácido gálico en Miligramos por gramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMDD	Mil Millones de Dólares
N	Nitrógeno
Na	Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NH_4^+	Amonio
nm	Nanómetros
NO_2^-	Nitrito
NO_3^-	Nitrato
NT	Nitrógeno total
O_2^-	Anión super óxido
O_2	Oxígeno Molecular
OD	Oxígeno Disuelto
ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
OH^-	Ión Hidroxilo
ONU	Organización de las Naciones Unidas
P	Fósforo

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

(Continuación)

PCAV	Productos Comerciales de Alto Valor
PDS	Fitoeno Desaturasa
PET	Polietileno Tereftalato
PO_4^{3-}	Fosfato
PSY	Fitoeno Sintasa
PT	Fósforo total
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
RPM	Revoluciones por Minuto
s	Segundos
SADM	Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey
USD	Dólares
V/V	volumen volumen
VVM	Volumen de aire por Volumen de líquido por Minuto
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
µmoles m^{-2} S^{-1}	Micromoles por metro cuadrado por segundo
µmolET g^{-1}PS	Micromoles equivalentes de Trolox por gramo de peso seco

CONTENIDO

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS 6
LISTA DE TABLAS 10
LISTA DE FIGURAS 11
CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN 12
1.1 INTRODUCCIÓN 12
1.2 JUSTIFICACIÓN 13
CAPÍTULO II ANTECEDENTES 15
2.1 CONTAMINACIÓN DE CUERPOS DE AGUA 15
2.1.1 Situación del agua en México 15
2.1.2 Eutrofización 16
2.2 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES 17
2.3 ECONOMÍA CIRCULAR DEL AGUA 18
2.4 CULTIVO DE MICROALGAS CON EFLUENTES SECUNDARIOS 20
2.4.1 Floculación en cultivos de microalgas 21
2.5 PRODUCTOS COMERCIALES DE ALTO VALOR (PCAV) 22
2.5.1 Obtención de PCAV bajo condiciones de estrés 23
2.5.1.2.1 28
CAPÍTULO III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 31
3.1 HIPÓTESIS 31
3.2 OBJETIVOS 31
3.2.1 Objetivo general. 31
3.2.2 Objetivos específicos 31
3.3 APORTACIÓN CIENTÍFICA 32
CAPÍTULO IV MATERIALES Y MÉTODOS 33
4.1 Área de trabajo 33
4.2 Disposición de residuos 33
4.3 PLAN DE TRABAJO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN 34
4.4 REACTIVACIÓN DEL CONSORCIO DE MICROALGAS BR-UANL-01 34
4.4.1 Monitoreo de pH 36
4.4.2 Monitoreo de PO_4^{3-} 36

4.3.1 Cosecha de biomasa microalgal 37
4.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROALGAS 37
4.6 PRUEBAS DE INDUCCIÓN DE ESTRÉS PARA LA GENERACIÓN DE PIGMENTOS 37
4.7 LIOFILIZACIÓN DE BIOMASA 39
4.8 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS 39
4.8.1 Extracción sólido-líquido 39
4.8.2 Extracción asistida con ultrasonido 40
4.9 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO 40
4.10 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS 41
4.10.1 Actividad antioxidante por el radical ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$) 41
4.10.2 Actividad Antioxidante por el método del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) 41
CAPÍTULO V RESULTADOS Y DISCUSIÓN 43
5.1 REACTIVACIÓN DEL CONSORCIO MICROALGAL BR-UANL-01 Y EFECTOS EN EL pH DEL MEDIO 43
5.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CONSORCIO BR-UANL-01 45
5.2.1 *Scenedesmus spp.* 46
5.2.2 *Chlorella spp.* 47
5.2.3 *Microcystis spp.* 48
5.2.4 *Leptolyngbya spp.* 50
5.3 OBTENCIÓN DE PIGMENTOS A PARTIR DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS 51
5.4 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS INTRACELULARES Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO 56
5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS 60
5.5.1 Actividad antioxidante por el radical ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$) 61
5.5.2 Actividad Antioxidante por el método del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP) 62
CAPÍTULO VI CONCLUSIONES 64
CAPÍTULO VII REFERENCIAS 65
ANEXO I Análisis de varianza de monitoreo de pH en fotobiorreactores con inducción de estrés.. 76
ANEXO II Análisis de varianza de monitoreo de PO_4^{3-} en fotobiorreactores con inducción de estrés 77

LISTA DE TABLAS

MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Parámetros fisicoquímicos del Efluente Secundario Tratado (EST), utilizada como medio de cultivo	35
4.2 Condiciones de operación de fotobiorreactores para la activación del consorcio	36
4.3 Condiciones de operación de fotobiorreactores, con condiciones de inducción de generación de pigmentos a partir de estrés	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Porcentaje de remoción de fosfatos en fotobiorreactores con inducción de estrés	54
5.2 Resultados del análisis por HPLC de los extractos MeOH muestras extraídas con ultrasonido y ByD extracción sólido líquido; subíndice C sin estrés y subíndice E muestra estresada	56
5.3 Concentraciones de luteína reportadas por investigaciones previas.	57-58
5.5 Porcentajes de inhibición del radical ABTS obtenidos por los extractos del consorcio BR-UANL-01.	62
5.6. Resultados de la prueba antioxidante FRAP, obtenidos por los extractos del consorcio BR-UANL-01, expresados en mg de equivalente de ácido gálico por gramo	63

LISTA DE FIGURAS

ANTECEDENTES

2.1 Modelo económico lineal (MEL)…… 19

2.2 Modelo económico circular (MEC)…… 19

2.3 Ruta metabólica de producción de carotenoides en microalgas (adaptado de Cezare-Gomes *et al.,*2019) …… 26

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Plan de trabajo de la investigación…… 34

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Valores de pH durante la reactivación del consorcio BR-UANL-01. ……... 42

5.2 Flóculo del consorcio BR-UANL-01, visto en microscopio a 10x Imagen: Edwin A. Fariz Salinas…… 45

5.3 Vista microscópica general del flóculo disgregado y de las especies que conforman el consorcio BR-UANL-01 a 40x. Imagen: Edwin A. Fariz Salinas…… 46

5.4 *Scenedesmus sp*. presente en el consorcio BR-UANL-01 Imagen: Edwin A. Fariz Salinas y Carter, (2018)…… 47

5.5 *Chlorella sp.* Presente en el consorcio BR-UANL-01. Imagen: Edwin A. Fariz Salinas y Chioccioli *et al.,* (2014)…… 48

5.6 *Microcystis spp.* Presente en el consorcio BR-UANL-01 Imagen: Edwin A. Fariz Salinas y Namzaraev, 2010 …… 49

5.7 *Leptolyngbya sp*. Presente en el consorcio BR-UANL-01 Imagen: Edwin A. Fariz Salinas y AlgaeBase 2019……. 50

5.8 Biomasa liofilizada del consorcio BR-UANL-01 después de ser sometidos a estrés ambiental …….. 52

5.9 Monitoreo del pH en cultivo del consorcio BR-UANL-01 en EST con inducción de estrés mediante diferentes tratamientos …… 53

5.10 Monitoreo de PO_4^{3-} en cultivo del consorcio BR-UANL-01 en EST con inducción de estrés mediante diferentes tratamientos …… 53

5.11 Espectro de absorción resultante del barrido espectral del estándar de luteína…… 59

5.12 Espectros de absorción de los picos correspondientes a luteína…… 60

CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN

El agua es sin duda, el recurso más importante con el cual se cuenta, ya que gran parte de los procesos la involucran ya sea de manera directa o indirecta. Uno de los problemas que pone en riesgo la disponibilidad y calidad de este recurso es la contaminación, esto se debe principalmente a las descargas indiscriminadas a cuerpos receptores y el aumento de la demanda para cubrir las necesidades de la sociedad, llevando poco a poco al desabasto de este recurso vital (Mahapatra *et al.,* 2018).

Una de las maneras de enfrentar este problema es la utilización de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR), dónde es disminuida la carga contaminante. Debido a que los efluentes contaminados no deben ser desechados directamente a ríos, lagos o mares sin ser tratados, ya que se pone en riesgo a los ecosistemas en contacto con dichos efluentes. Además, se debe de tener especial atención en el vertido de sustancias inorgánicas que puedan acelerar el crecimiento vegetal, tales como amonio, nitratos y fosfatos, los cuales contribuyen con la eutrofización de las masas de agua receptoras (Martínez, 2000).

La eutrofización se define como el enriquecimiento de agua con nutrientes, especialmente nitrógeno (N) y fósforo (P) a un ritmo tal que no puede ser compensado de forma natural por autodepuración (Khan y Ansary, 2005). Aunque ocurre de forma natural y estacional, se ha acelerado considerablemente, debido al aumento de la población e intervención humana que, en consecuencia, ha incrementado la tasa de nutrientes hacia acuíferos receptores por descargas (US EPA, 2000).

Una de las consecuencias más devastadoras concernientes a la eutrofización es la posible pérdida de recursos hídricos y acuáticos. Por esta razón, se buscan alternativas que puedan reducir la tasa de nutrientes en efluentes secundarios y minimizar los efectos de la

eutrofización, a la vez de recuperar dichos nutrientes para reciclarlos, para de esta manera adoptar el nuevo modelo económico propuesto por las naciones unidas, la denominada Economía Circular. Este modelo propone, entre otras cosas, reducir la extracción de los recursos y hacer eficaces los procesos de producción, además de aprovechar los desechos para la obtención de materias primas que se reutilizan en la manufactura cerrando el ciclo (Ghisellini, Cialani, y Ulgiati, 2016).

Las microalgas son microorganismos que se caracterizan por ser capaces de remover eficientemente nitrógeno, fósforo y metales pesados de una gran variedad de aguas residuales y de efluentes secundarios (Zhou *et al.* 2012). Además de funciones fisiológicas altamente competitivas, ciclos rápidos de reproducción, bajos requerimientos de nutrientes y la adaptación a una amplia gama de radiación solar. Asimismo, estos microorganismos pueden formar parte de procesos en sistemas biológicos de depuración de contaminantes, tanto en aguas tratadas como en efluentes con características eutróficas, siempre que las condiciones favorezcan el crecimiento de estos microorganismos (Gordon y Polle, 2007).

Como resultado de la adición de las microalgas al proceso de depuración, además del control de las concentraciones de P y N, es posible proponer una tecnología basada en la dualidad de uso de dichos microorganismos para el tratamiento de efluentes secundarios y para la producción/valorización de biomasa a escala industrial (Beltrán-Rocha *et al.,* 2017). En relación con la calidad final de la biomasa resultante del proceso de eliminación de nutrientes, ésta pueda derivar en una gran gama de aplicaciones, ya sea la obtención de ficobiliproteínas, precursores de vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides entre otros productos de interés industrial y comercial (Borowitzka, 2013).

1.2 JUSTIFICACIÓN

En estudios previos realizados en el Laboratorio de Investigación de Ciencias Ambientales (LICA), de la FCQ, UANL, fue reportado un consorcio de microalgas nativas del estado de Nuevo León, con eficiente capacidad de remoción de nutrientes; nitrógeno (N) y fósforo (P), en efluentes de plantas tratadoras de aguas residuales, llevándolos a niveles de

cumplimiento ambiental según normatividad internacional como la Directiva 91/271/CEE de la Unión Europea (Consejo CE, 1991). Durante el proceso, como subproducto se generó una cantidad considerable de biomasa microalgal (a un costo mínimo), de la cual, además del beneficio ambiental de mejorar la calidad del agua, se pueden obtener bioproductos que interesen a las industrias, tales como: pigmentos, alimento animal, componentes de cosméticos, fármacos y suplementos nutricionales para consumo humano dado el alto contenido de proteínas, vitaminas y polisacáridos contenidos en la biomasa de las microalgas.

A la fecha, existe muy poca información sobre una caracterización integral a la biomasa de microalgas nativas de Nuevo León. Por tal motivo, este proyecto tuvo como finalidad el contribuir a la generación de conocimiento referente a la identificación y caracterización general de componentes potencialmente revalorizables, a partir de la biomasa microalgal obtenida como subproducto del proceso antes mencionado, además de evaluar condiciones de cultivo (de bajo costo) que favorezcan la producción de dichos compuestos por las microalgas.

La presente investigación representa una primera fase de generación de conocimiento que vislumbra pruebas y bioensayos posteriores con la meta final de obtener y optimizar la generación de productos de interés comercial, para así contribuir a los Objetivos de Desarrollo Sustentable de la Agenda 2030 de la ONU y el proyecto de nación 2018-2024 que incluyen aspectos como el cuidado del agua, la sustentabilidad y el desarrollo regional.

CAPÍTULO II
ANTECEDENTES

2.1 CONTAMINACIÓN DE CUERPOS DE AGUA

2.1.1 Situación del agua en México

Uno de los recursos más valiosos hoy en día, es el agua, ya que está involucrada tanto en labores cotidianas, como en procesos de producción donde es usada directa o indirectamente. Sin embargo, toda agua utilizada en dichos procesos pierde sus características por la adición de compuestos o materia orgánica e inorgánica, resultando en un caudal contaminado (Mahapatra, 2015).

En México se estima que anualmente se reciben aproximadamente 1,449,471 millones de metros cúbicos de agua en forma de precipitaciones, de la cual el 72.5% retorna a la atmósfera por evapotranspiración[1], 21.2% escurre a cuerpos de agua superficiales (ríos, lagos, lagunas y arroyos), y un 6.3% se infiltra al subsuelo de forma natural para recarga de acuíferos. Por tanto, en el país existen 446,777 millones de metros cúbicos de agua renovable disponible (CONAGUA, 2016). De esta forma, se estimó en el 2015 que el agua *per cápita* a nivel nacional era de 3, 338 m^3/hab/año y se espera que para el año 2030 la disponibilidad per cápita se reduzca a 3,253 m^3/ hab/año (CONAGUA, 2011 y 2015).

Uno de los grandes problemas que afectan a los cuerpos de agua tanto superficiales como subterráneos, es la contaminación por descargas de aguas residuales. Éstas generan alteraciones significativas en los ciclos biogeoquímicos generales y promueven el aumento en las concentraciones de nitrógeno, fósforo y carbono. Dichos nutrientes no son asimilables por los ecosistemas acuáticos y les causa efectos directos, así como también a los ecosistemas terrestres que dependen de ellos. (Rojas-Mayorquín, 2011).

[1] Es la pérdida de humedad de una superficie por evaporación directa junto con la pérdida de agua por transpiración de la vegetación

Según datos del INEGI, (2018), el 54% de las aguas residuales se descargan en ríos o arroyos, además que existen 2,355 sitios de descargas de aguas de desecho, siendo Estado de México, Puebla y Veracruz las principales entidades que contribuyen en la contaminación de cuerpos de agua, representando el 30% del total nacional.

2.1.2 Eutrofización

Uno de los grandes problemas que trae consigo la descarga de aguas residuales sin tratamiento previo, es el aumento del estado trófico en los cuerpos de agua, el cual indica la relación entre nutrientes y crecimiento de materia orgánica en dichas masas de agua. La eutrofización es el proceso de cambio de un estado trófico a otro nivel superior por la adición de nutrientes, lo que resulta en un problema ambiental, el cual reduce la calidad del agua y altera la estructura de los ecosistemas, así como las funciones ambientales de los mismos (Dodds *et al.,* 2009).

Si bien la eutrofización se produce en forma natural, normalmente está asociada a fuentes antropogénicas de nutrientes (Moreno-Franco, Quintero y López, 2010). La inapropiada disposición de aguas no tratadas y el incremento de la carga de nutrientes de origen doméstico son causantes de este fenómeno. Este proceso ocurre cuando una masa de agua oligotrófica[2] es enriquecida por nutrientes, es decir, un incremento en la concentración de nitrógeno (N) y fósforo (P), los cuales favorecen el crecimiento y la multiplicación del plancton, lo que aumenta la turbidez del agua. Durante la eutrofización se genera un aumento en la producción y acumulación de carbono orgánico, el cual llega a sobrepasar la capacidad de asimilación de los cuerpos de agua, disminuyendo el oxígeno disuelto (OD), lo cual provoca la reducción de la biodiversidad y favorece la aparición de microorganismos tóxicos en el agua (Beltrán-Rocha, 2017). Sin embargo, la pérdida de OD se incrementa cuando el fitoplancton satura la superficie del cuerpo de agua haciendo que el oxígeno se libere a la superficie.

[2] Es aquella que contiene niveles bajos de nutrientes por lo tanto una población de microalgas equilibrada y aguas claras.

Posteriormente cuando el fitoplancton entra en su fase de decaimiento, las células muertas se depositan al fondo del cuerpo de agua. Los impactos ecológicos adversos causados por la eutrofización pueden ser categorizados dentro de tres aspectos importantes:

1. La reducción de la biodiversidad y el reemplazo de las especies dominantes.
2. Incremento de la toxicidad de las masas de agua.
3. El incremento de la turbidez del agua y la disminución de las actividades económicas que dependen del cuerpo de agua.

Tan sólo Estados Unidos, reporta una pérdida económica estimada de 2.2 MMDD por año, a raíz de la eutrofización en cuerpos de agua dulce. Por esta razón uno de los requisitos importantes en el tratamiento de aguas es la remoción de nutrientes y metales tóxicos, a niveles aceptables, previo a la descarga y reutilización (Zhou *et al.,* 2012).

2.2 TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

Las aguas residuales son efluentes afectados en su calidad por acciones antropogénicas, pueden provenir tanto de poblaciones o de industrias (Fariz, 2016). El vertido constante de las aguas residuales pone en riesgo la oferta hídrica mundial (Montaigne y Essick, 2002) y acelera procesos como la eutrofización, a causa de las enormes cantidades de nutrientes vertidos.

Para eliminar este tipo de contaminantes tanto en aguas urbanas como industriales existen Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR), las cuales responden a las necesidades de cada efluente, por lo general este procedimiento consta de un pretratamiento, seguido de un tratamiento primario (físico), tratamiento secundario (biológico) y en ocasiones, terciario (químico) (Fariz, 2016). Sin embargo, estas técnicas sólo logran la eliminación de los contaminantes orgánicos, pero con un efecto mínimo sobre la eliminación de contaminantes inorgánicos (Travieso, 2008) y como consecuencia no dan solución a la contaminación por alto contenido de nutrientes como: nitratos, amonio y también iones de

fosfato, los cuales llegan a ser los responsables de la eutrofización en los cuerpos de agua y de la floración de microalgas (Sawayama *et al* 1998).

Según datos de CONAGUA, (2017), en México existen 5,577 PTAR de las cuales 45.5% corresponden a PTAR municipales y el 54.5% a industriales a pesar de esto aún existen grandes retos ya que a la fecha solo el 35.36% de las aguas residuales son tratadas. Sin embargo, hoy en día existen ciudades y empresas, que se niegan o no pueden costear las PTAR, ya que éstas requieren infraestructura, mano de obra calificada, energía y mantenimiento, lo que significa pérdidas económicas por no obtener beneficio económico a partir de su implementación. Además, revertir los daños en los cuerpos de agua afectados por descargas sin tratamiento alguno, significa renovar y modificar las prácticas, tanto a pequeña como en gran escala (Mahapatra *et al.,* 2018).

2.3 ECONOMÍA CIRCULAR DEL AGUA

Como se mencionó anteriormente, aún existe negligencia por parte de ciertos sectores en invertir en PTARS, esto se debe principalmente a que no representa una ventaja o ingreso económico tangible. Por esta razón, se deben buscar estrategias económicas que involucren el manejo y aprovechamiento de los desechos, así como hacer eficientes los procesos de producción y de esta manera reducir la contaminación del medio.

La economía circular ofrece una nueva forma de correlacionar recursos naturales, procesos eficientes, mercado y compradores, promoviendo la sustentabilidad y la eficiencia de recursos. Debido principalmente a que el modelo económico actual, es unidireccional ya que va de la extracción de recursos naturales, aprovechamiento/manufactura, utilización del producto y desecho, este modelo no tiene ningún interés en los problemas medioambientales que se generan a partir de la extracción desmedida o de la falta de gestión de los desechos, (Simon, 2018) el modelo económico actual es ilustrado en la **Figura** 2.1.

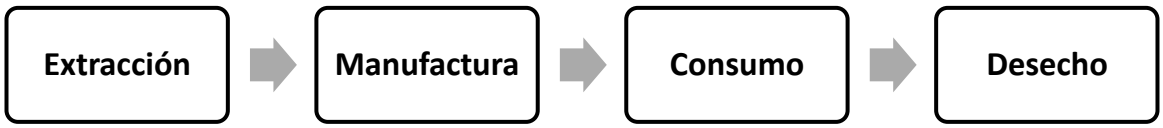


Fig. 2.1 Modelo económico lineal (MEL)

Por esta razón se sugiere un cambio de modelo económico en el cual disminuya la extracción de recursos y se lleven a cabo procesos eficientes y recuperación de materiales de desecho, para que estos funjan como materias primas comenzando de nuevo el ciclo. Este modelo económico es mostrado en la **Figura** 2.2 (Ghisellini, Cialani, y Ulgiati, 2016).

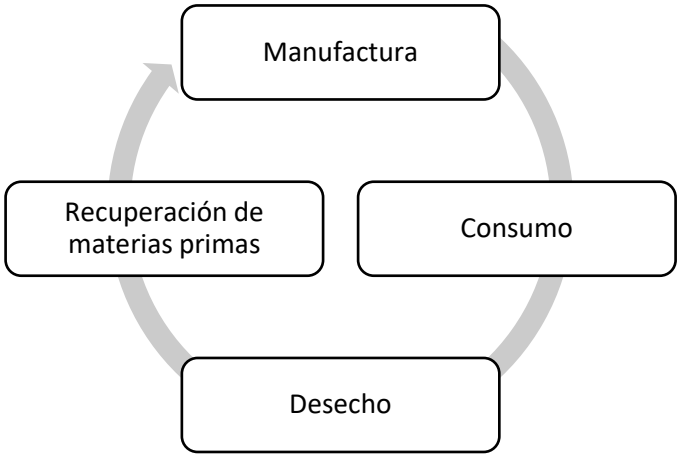


Figura 2.2 Modelo económico circular (MEC)

En el caso de las aguas tratadas, el MEC provee una alternativa al recurso hídrico, particularmente en lugares donde el agua escasea, y puede ser utilizada ya sea para necesidades industriales, así como para riego (Hardy *et al.* 2015). Esto último se debe a que los efluentes secundarios contienen nutrientes como N y P, además de trazas de compuestos como Sodio (Na), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Hierro (Fe) entre otros.

De esta manera el agua puede ser parte del MEC, en donde se aproveche la carga nutritiva a un costo bajo, para posteriormente obtener diversos productos que puedan ser comercializables o aprovechables continuando con el ciclo y de esta manera reducir la cantidad de nutrientes depositados en cuerpos de agua receptores, evitando así problemas

graves generados por la alta concentración de estos, además de optimizar los procesos de tratamiento de aguas.

2.4 CULTIVO DE MICROALGAS CON EFLUENTES SECUNDARIOS

Los tratamientos biológicos utilizados en las plantas de tratamiento de aguas residuales tienen la capacidad de remover la mayor parte de la carga de nutrientes, por lo cual son los más utilizados en este tipo de procesos. A pesar de esto, los efluentes secundarios[3] generalmente mantienen una concentración de nutrientes ambientalmente significativa específicamente N y P (Wang, *et al.* 2017).

De acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, los parámetros de descarga para efluentes secundarios de PTAR deben estar entre los siguientes rangos: fósforo total 5-30 mg/L y nitrógeno total 15-60 mg/L, esta carga residual de nutrientes puede causar problemas de eutrofización en cuerpos receptores, generando un sinnúmero de problemas. Es por eso que, la remoción de nutrientes se ha convertido en una de las prioridades de las PTAR (Gao *et al.,* 2018). Muy pocos procesos pueden remover simultáneamente N y P inorgánico de las aguas, además muchos métodos requieren materiales o equipos externos para realizar una remoción eficiente (Hoh, Watson y Kan, 2016).

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que asimilan N y P inorgánicos transformándolos en biomasa (Ometto *et al.,* 2014). La habilidad que estos microorganismos tienen para asimilar nutrientes y metales pesados de efluentes las hacen extremadamente atractivas, como un método de tratamiento biológico para aguas residuales, y efluentes secundarios, al ser un método sostenible y de bajo costo (Prabhakara, 2015). Éstas actúan como biocatalizadores rápidos para la fijación de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, produciendo a su vez compuestos intracelulares de gran valor tales como: proteínas, lípidos, carbohidratos, pigmentos, vitaminas y minerales.

[3] Efluente de agua tratada

En los últimos años, los tratamientos de aguas basados en microalgas han llamado la atención, debido a ventajas como la remoción simultánea de N y P, la rentabilidad y seguridad ecológica, debido a que no son requeridos productos químicos adicionales para el crecimiento, la capacidad de fijar gases de efecto invernadero como CO_2, la generación de oxígeno y la generación de biomasa para la obtención de productos de gran valor comercial (Hoh, Watson y Kan, 2016).

2.4.1 Floculación en cultivos de microalgas

Los cultivos de microalgas a nivel industrial pueden realizarse en sistemas abiertos o cerrados. No obstante, uno de los mayores retos que se presentan es la separación del medio de cultivo de las microalgas o también llamada "cosecha de biomasa". Esta es una etapa importante, ya que, una alta concentración de biomasa impide el paso homogéneo de fotones a las células, lo cual se traduce a una reducción de la productividad (Molina Grima *et al.,* 2003; Schlesinger *et al.,* 2012).

Al no disponer de una tecnología de recuperación de biomasa eficiente, se puede tener un impacto negativo generando costos extras en el proceso que van desde el 20 al 30% del valor de producción (Rashid *et al.,* 2014). Cuando el proceso es para productos comerciales de alto valor (PCAV), la cosecha se realiza por centrifugación, sin embargo, esta operación unitaria incrementa los costos de producción (Brentner *et al.,* 2011).

Una alternativa viable es concentrar las células por floculación, ya que durante este proceso éstas forman grandes agregados que pueden separarse del medio por gravedad. Algunos géneros de microalgas tienen la capacidad de inducir la autofloculación de manera espontánea cuando el pH aumenta por encima de 9, debido a la actividad metabólica de las células (Spilling, *et al.,* 2010).

La versatilidad de las microalgas para poder crecer en efluentes secundarios y la capacidad para inducir la autofloculación por acción metabólica, contribuyen a la

rentabilidad de generación de biomasa; y acorde a la calidad final del producto, se puede derivar en una gran gama de aplicaciones, y en productos de interés industrial y comercial (Borowitzka, 2013).

2.5 PRODUCTOS COMERCIALES DE ALTO VALOR (PCAV)

Las microalgas son organismos eucariotas unicelulares muy diversos, que a través de la fotosíntesis son capaces de convertir la energía lumínica en energía química para producir nuevas células (biomasa) u oxígeno a partir dióxido de carbono (CO_2), agua y otros nutrientes tales como: Hidrógeno (H), Oxígeno (O), Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K) (Chanakya, *et al.* 2013).

Las microalgas han sido altamente estudiadas por su rápido crecimiento y su habilidad de asimilar, metabolizar y fijar elementos esenciales; además de la capacidad para ser cultivadas tanto en agua dulce como salina e inclusive en efluentes secundarios y agua residual. Estos atributos las convierten en un recurso prometedor y altamente sostenible no sólo para proveer de alimento a organismos superiores, sino también para la producción de numerosos compuestos bioactivos, los cuales pueden ser aprovechados para fines comerciales (Richmond y Hu, 2013). Dichos microorganismos contienen grandes cantidades de proteínas, lípidos y carbohidratos que pueden servir como materia prima para diferentes productos (Vanthoor-Koopmans *et al.,* 2013).

Los lípidos extraídos de estas pueden fungir como materia prima para la producción de biodiesel. Además, las cadenas largas de ácidos grasos producidas por microalgas tienen una función importante como suplementos alimenticios saludables. Por otro lado, los carbohidratos pueden servir como fuente de carbono para las industrias de fermentación, reemplazando las fuentes de carbohidratos convencionales como los azúcares simples o la biomasa lignocelulósica tratada. Las proteínas y pigmentos generados a partir de la biomasa microalgal, son de interés industrial ya que muestran propiedades deseadas por la industria farmacéutica para el tratamiento de algunas enfermedades (Yen *et al*., 2013).

2.5.1 Obtención de PCAV bajo condiciones de estrés

Las microalgas son una fuente rica en metabolitos biológicamente activos (Zhang *et al.* 2014). Bajo condiciones no óptimas para su desarrollo (irradiación lumínica, temperatura, nutrientes y salinidad), estos microorganismos reaccionan cambiando sus rutas y estrategias metabólicas, con el fin de enfrentar las dificultades ambientales. Esto modifica la dinámica metabólica afectando la composición de la biomasa, fluctuando el contenido de los compuestos intracelulares (Hu, 2004).

Cuando algunas especies de microalgas están bajo estrés, la síntesis y acumulación de diferentes productos puede ser inducida. Se cree que la síntesis de dichos metabolitos es la respuesta de las microalgas para mantener sus tasas de crecimiento o en su defecto la supervivencia de las células en condiciones ambientales desfavorables. Es aquí, donde se producen los metabolitos secundarios (Borowitzka, *et al*., 1991). Éstos son compuestos que no son usados por las microalgas para funciones metabólicas principales estos incluyen compuestos con actividad antioxidante, hormonas, antibióticos y algunas toxinas (Skjånes *et al.,* 2012). Dado que muchos de estos compuestos tienen gran importancia en el mercado, la explotación de la biomasa de microalgas para la extracción de productos de valor agregado en conjunto con el tratamiento de aguas residuales o efluentes secundarios como fuente de nutrientes, garantiza su viabilidad técnico-económica sin externalidades ambientales.

Por lo tanto, entender la respuesta de las microalgas al estrés y la manipulación de las condiciones ambientales del medio podrían generar cepas de microalgas que producen eficientemente moléculas diana (Wan *et al.,* 2019). Diferentes condiciones de estrés como salinidad, temperatura y flujo de fotones son inductores para la síntesis de pigmentos carotenoides en especies de microalgas (Minhas *et al.,* 2016). Se tienen reportes de acumulación de pigmentos por inducción de estrés en diversas cepas como: *Dunalliela tertiolecta* capaz de acumular 40 mg L^{-1} en condiciones de alta intensidad lumínica 300 µE m^{-2} s^{-1} junto con un déficit de nitrógeno (Kim *et al.,* 2013), *Desmodesmus sp.* F51 puede acumular luteína bajo estrés lumínico (600 µmoles m^{-2} s^{-1}) y alta temperatura (35°C) generando hasta 3.6 mg L^{-1} (Xie *et al.,* 2013), *Haematococcus pluvialis* puede acumular hasta

4% de astaxantina en peso seco con inducción de estrés nutricional (Boussiba *et al.* 1999). Estos ejemplos indican que es una estrategia factible la manipulación de las condiciones ambientales de crecimiento para incrementar la producción de pigmentos (Wan *et al.,* 2019). Recientemente los pigmentos sintetizados por microalgas como: β-caroteno, luteína, astaxantina y zeaxantina han llamado mucho la atención debido a sus aplicaciones en diferentes industrias como: alimenticia, cosmética y farmacéutica (Larkum *et al.,* 2012).

2.5.1.1 PIGMENTOS

Los pigmentos son moléculas esenciales en el metabolismo fotosintético y en la pigmentación de las plantas, así como de las macro y microalgas (Mahapatra *et al.,* 2018). Ya que participan activamente en la fotosíntesis, absorben el exceso de energía lumínica y disminuyen la energía de las especies reactivas de oxígeno para proteger los fotosistemas (Guerrero *et al.,* 1999; Faraloni y Torzillo, 2017). Los pigmentos son moléculas químicas coloridas que absorben y reflejan ciertas longitudes de onda de luz visible. Basados en su estructura y acción son agrupados en clorofilas, carotenoides y ficobilinas. La clorofila está presente en las plantas superiores y en algas Clorofitas, mientras que los carotenoides están presentes tanto en algas como en cianobacterias y por último las ficobilinas que están presentes únicamente en cianobacterias y en algunas algas rojas o Rodofitas (Chew *et al.,* 2017).

Sin embargo, la cantidad de carotenoides presentes naturalmente en las células microalgales es mínima, el promedio de contenido de carotenoides va desde 0.1 al 0.2% hasta llegar a un 14% en peso seco. Por lo que se requieren métodos para que la microalga se vea obligada a generar cantidades importantes de carotenoides a través de estrés. Los tipos de estrés que inducen a la acumulación de estos pigmentos incluyen un incremento en la temperatura del medio de crecimiento, un aumento o disminución de la intensidad lumínica (flujo de fotones), salinidad, cambios en la concentración de nutrientes, así como inhibidores del proceso metabólico (Kurmen, González y Klotz, 2013; Markou y Nerantzis, 2013).

2.5.1.2 CAROTENOIDES

Los carotenoides son compuestos liposolubles, hidrofóbicos con estructuras de aproximadamente 40 carbonos que contienen doble enlace conjugado, dotándolos de una mayor capacidad de reducir los radicales libres. Dichos compuestos pueden presentar una coloración café, roja, naranja y amarilla. Éstos ejercen una función protectora ya que resguardan a los fotosistemas del daño oxidativo, por su alto poder antioxidante y son localizados generalmente en la membrana tilacoide, sin embargo, también pueden ser encontrados en el citoplasma o en los estromas (Takaichi, 2011).

Existen dos tipos de carotenoides los cuales son carotenoides primarios y secundarios. Los primeros están directamente involucrados en el proceso fotosintético (β-caroteno y luteína) y su función principal es la captación de la luz además de la estabilización de radicales O_2. Los carotenoides secundarios son aquellos generados y acumulados, en condiciones de estrés ambiental (astaxantina y cataxantina), jugando un rol importante en la foto-protección y estabilización de la célula, además de disipar el exceso de energía (Lemoine y Schoefs, 2010).

Basados en la estructura química de los carotenoides estos son divididos en: Carotenos; incluye β-caroteno y licopeno (moléculas no oxigenadas) y xantofilas; incluye astaxantina, luteína y cataxantina (moléculas oxigenadas) (Markou y Nerantsis, 2013)

Como se mencionó anteriormente, el estrés puede ser dado por diversos factores ambientales. Estas variaciones en el medio de crecimiento generan un estrés oxidativo, es decir, un aumento en las especies reactivas de oxígeno (u oxidantes) como el anión superóxido (O_2^-). Esto conlleva a una disminución de los mecanismos de detoxificación, dando pie a la carotenogénesis[4]. A partir de la condensación del geranil-geranil difosfato (GGPP) y con ayuda de enzimas como la fitoeno sintasa (PSY), fitoeno desaturasa (PDS), β-caroteno desaturasa (BKT) entre otras; dan paso a la síntesis de pigmentos carotenoides con

[4] Carotenogénesis: síntesis de carotenoides

el objetivo de estabilizar la célula. Dicha ruta metabólica es mostrada en la **Figura** 2.3 (Kobashi, 2003 Londoño-Londoño, 2012; Cesare-Gomes *et al.,*2019).

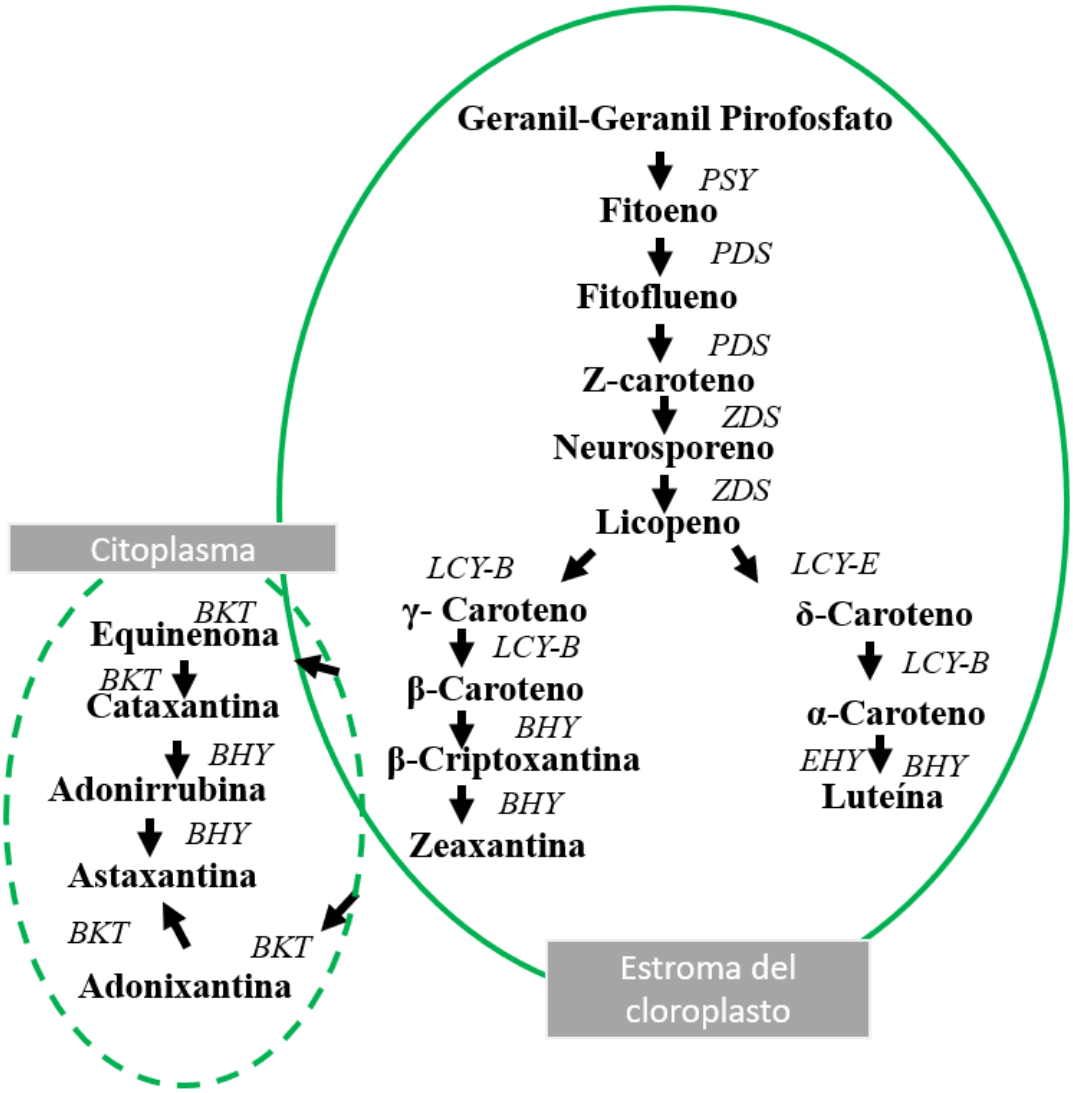


Fig. 2.3 Ruta metabólica de producción de carotenoides en microalgas (adaptado de Cezare-Gomes *et al.,*2019)

Los carotenoides que usualmente son sintetizados a partir de microalgas son: astaxantina, β-caroteno y luteína. Cabe recalcar que existe una gran diversidad de microalgas que tienen la capacidad de acumularlos. Sin embargo, no todas son candidatas para la explotación a nivel industrial, por las condiciones de crecimiento (Kothari, *et al.,*2017). Por lo tanto, los

géneros más socorridos para su cultivo a nivel industrial o comercial son: *Dunalliela salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*, y *C. vulgaris* (Lemoine y Schoefs, 2010).

Debido al color intenso y a las propiedades antioxidantes, varios carotenoides como la luteína han adquirido una mayor demanda, con diversos fines que van desde la utilización en alimento de animales en la acuacultura, colorantes, aditivos cosméticos, hasta antioxidantes en alimentos nutraceúticos[5], productos del cuidado de la piel y protectores solares (Colla *et al.,*2007).

2.5.1.2.1 LUTEÍNA

La luteína es un pigmento primario de la familia de las xantofilas, está presente en plantas, así como en algas y microalgas, está relacionado con la captación de fotones durante la fotosíntesis y en la protección de los fotosistemas del daño foto-oxidativo. Es responsable de dotar de coloración amarilla a dichos organismos fotosintéticos. En el ser humano la luteína junto a la zeaxantina es acumuladas en la mácula ocular, siendo un pigmento que protege la retina de la luz azul, protege a los ojos del daño foto degenerativo por sus propiedades antioxidantes, además de beneficiar la agudeza visual (Krinsky *et al*., 2003).

La luteína es un carotenoide comúnmente utilizado en las industrias nutricional, alimentaria, cosmética y farmacéutica. Esto se debe principalmente a su actividad antioxidante y a la capacidad de brindar color amarillo, naranja o rojo a productos de dichas industrias (Arathi, *et al*. 2015).

Usualmente este carotenoide es extraído a partir de los pétalos amarillos de las flores de caléndula del género *Tagetes sp.*, pero una de las desventajas más grandes radica en la dependencia de las estaciones del año. Además, el cultivo de *Tagetes sp.* necesita extensiones de terreno muy grandes y mano de obra especializada para la siembra y cosecha de flores, obteniendo al final rendimientos muy bajos (Lin *et al.,*2015).

[5] Nutraceúticos: alimentos que contienen aditivos saludables y nutritivos que a su vez aporta un beneficio medicinal a la salud.

La luteína puede ser sintetizada por microalgas, eliminando por completo la dependencia de las estaciones del año para la generación del pigmento, reduciendo también la necesidad de grandes extensiones de terreno para el cultivo. Algunos de los géneros de microalgas utilizados para este fin son *Chlorella spp.*, (Wei et al., 2008), *Muriellopsis spp* (del Campo *et al.,* 2000), *Scenedesmus spp*. (Sánchez *et al*., 2008) y *Chlamidomonas spp* (Garbayo *et al*., 2008). El contenido de luteína a diferencia de otros carotenoides es muy similar en las especies antes mencionadas.

Sin embargo, puede existir una mayor acumulación de luteína cuando la célula está expuesta a estrés ambiental. Por ejemplo, *Muriellopsis spp.* se ve afectada cuando hay alta intensidad lumínica (460 µmoles m^{-2} S^{-1}), ya que el contenido de luteína disminuye (Del Campo *et al.,*2000; Minhas *et al.,*2016). Por el contrario, un aumento en la temperatura en un rango entre 28°C a 33°C y valores de pH entre 6 y 9, tienen como resultado el aumento significativo del contenido intracelular de luteína (Del Campo *et al.,* 2000). En el caso de *Scenedesmus almeriensis* se ve afectada por diversos factores como una alta intensidad lumínica (1700 µmol m^{-2} s^{-1}) o un incremento en la temperatura por encima de los 30°C. En ambos casos la producción de biomasa y el contenido de luteína intracelular aumenta (Markou, *et al.,*2013)

Gracias a la gran variedad de aplicaciones y la síntesis de luteína a partir de microorganismos que no dependan de las estaciones o de grandes extensiones de tierra, hoy en día este carotenoide es uno de los PCAV más demandados y con un mercado creciente.

2.5.1.2.1 MERCADO DE LUTEÍNA A NIVEL GLOBAL

Con el creciente aumento del mercado de los productos llamados “orgánicos” y la prohibición del uso de carotenoides sintéticos en muchos países debido a posibles riesgos a la salud, se han desarrollado métodos novedosos para la obtención de carotenoides por vías no convencionales, como la síntesis con microorganismos como las microalgas. Lo cual, ha

abierto las posibilidades para la obtención de productos de interés industrial a partir de microorganismos (Ambati *et al.,* 2018).

Teniendo en cuenta las necesidades del mercado actual y los conceptos de economía circular propuestos por la ONU como base del desarrollo sostenible, esto se traduce en el desarrollo de procesos altamente eficientes, aprovechando los desechos como materias primas y generando altos rendimientos.

Hoy en día las microalgas se han convertido en uno de los microorganismos con potencial para el cumplimiento de las necesidades del mercado actual de carotenoides. Primero por la versatilidad en la que pueden aprovechar el carbono, ya que estos microorganismos pueden presentar una nutrición fotoautótrofa, heterótrofa o mixotrófica, es decir que tienen una gran gama de formas de cultivo. Segundo los extractos provenientes de algas y microalgas han generado un nuevo sector en el mercado, debido a la variedad de usos en los cuales pueden ser aprovechados que van desde cápsulas antioxidantes que contienen extracto de *Spirulina spp.*, extracto de *Chlorella spp.* en bebidas saludables, cápsulas orales que contienen extractos de carotenoides de *Dunaliella spp*, o presentes en alimento funcional de mascotas o en biofertilizantes (Pulz y Gross, 2004).

En escala económica, la biomasa de microalgas tiene un potencial de mercado en billones de dólares (Kothari *et al*., 2017). Tan solo en 2004, la contribución en el mercado por parte de las algas fue (88%), polisacáridos (ficocoloides) (11%), ficosuplementos (1%), y en menor contribución aditivos del suelo, agroquímicos y alimento para animales, con una totalidad de 6,000 MDD (Craigie, 2011).

De acuerdo con la empresa Deinove Biotechnology Company en 2014, el mercado mundial de carotenoides ascendió a 1.4 MMDD. Los carotenoides sintéticos de la industria química representaron el 76% del mercado en 2014. El 24% restante fue de carotenoides naturales obtenidos a través de extracción y fermentación. Esta segunda categoría tendrá un crecimiento considerable para el año 2020 (3.9%) en respuesta de la demanda de los consumidores.

Los carotenoides sintéticos se vendieron entre $250 y $2,000 USD/kg, mientras que los naturales fueron vendidos entre $350 y $7,500 USD/kg. Estos rangos de precio tan amplios son el resultado de que algunos carotenoides se han convertido en productos básicos como la luteína y el β-caroteno, mientras que otros como el licopeno han mantenido su alto valor agregado (Deinove, 2016)

La luteína es utilizada en diversos productos, en su mayoría para el cuidado ocular y suplementos dietéticos. Estos últimos generan una demanda de alrededor de 13.5 millones de toneladas debido a la creciente preferencia de los consumidores por productos funcionales, impulsando así el crecimiento de esta industria. En regiones como Asia-Pacífico y Latinoamérica. Se contempla que para 2024 la demanda de suplementos dietéticos generará un crecimiento significativo del 6% (Global Market Insights, 2017).

Tan sólo en 2015 el mercado de luteína a nivel global fue de 135 MDD, generando ganancias significativas hasta el 2024 y se espera que para ese mismo año dicho mercado aumente en un 5.3% es decir alrededor de 142 MDD (Global Market Insights, 2017). Un aspecto importante que hay que considerar es que el precio de mercado depende en gran medida de la pureza del producto.

La expansión del mercado de la luteína a nivel global convierte a este carotenoide en uno de los más rentables, tanto por la versatilidad de aplicaciones como por el proceso de obtención a partir de levaduras, bacterias y microalgas. Así queda eliminada por completo la dependencia de las estaciones del año, así como de las grandes extensiones de tierra para el cultivo. Aunado a estas grandes ventajas, se puede realizar un proceso eficaz y eficiente que maximice la obtención de este carotenoide y reduzca los desechos, cumpliendo con uno de los objetivos del desarrollo sostenible propuesto por la ONU.

CAPÍTULO III
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Microalgas floculantes nativas (BR-UANL-01), cultivadas en un fotobiorreactor, utilizando como medio de cultivo un efluente de agua residual tratada (EST), son capaces de producir bioproductos de alto interés industrial y comercial.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1 Objetivo general.

Identificar bioproductos de alta demanda industrial y comercial a partir de microalgas nativas del estado de Nuevo León (BR-UANL-01), cultivadas en un fotobiorreactor utilizando efluentes secundarios tratados (EST) como medio de cultivo.

.

3.2.2 Objetivos específicos

I. Reactivar y mantener el consorcio BR-UANL-01, alimentado con un efluente de aguas residuales tratadas.
II. Identificar taxonómicamente un consorcio de microalgas floculantes BR-UANL-01
III. Inducir la generación de luteína a través de estrés.
IV. Realizar pruebas de extracción de luteína.
V. Analizar por cromatografía, el extracto obtenido.
VI. Realizar ensayos de actividad antioxidante del extracto.

3.3 APORTACIÓN CIENTÍFICA

El presente proyecto se desarrolló como seguimiento a proyectos previos realizados en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales, de la FCQ, UANL utilizando consorcios de microalgas nativos de Nuevo León para remoción de nutrientes de efluentes secundarios causantes de eutrofización en agua, así como el condicionamiento e inducción a la floculación de uno de dichos consorcios. Dada estas características demostradas previamente y la factibilidad de cosecha del consorcio seleccionado, esta investigación contribuye a evaluar la capacidad de dicho consorcio para generar productos comerciales de alto valor aprovechando nutrientes como nitrógeno y fósforo de aguas residuales tratadas. A la fecha no existe información reportada en la literatura sobre una caracterización de PCAV en biomasa de microalgas originarias de la región.

CAPÍTULO IV
MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo

Para realizar los trabajos de investigación de este proyecto, se contó con la infraestructura del LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA III y el LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AMBIENTALES (LICA) de la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS (FCQ) el cual proporcionó el consorcio BR-UANL-01 de su cepario, así como del LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA (FA) de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN (UANL) y LABORATORIO DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES (LICA) DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE NUEVO LEÓN.

4.2 Disposición de residuos

Los residuos generados durante el proceso de este proyecto de investigación se dispusieron y clasificaron de acuerdo con sus características y a los reglamentos establecidos por la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE NUEVO LEÓN, la FACULTAD DE AGRONOMÍA y la FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, de la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN. El Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas se asegurará de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos de acuerdo con los procedimientos para la clasificación de éstos.

4.3 PLAN DE TRABAJO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

A continuación, se indica el planteamiento de la realización del proyecto y un diagrama de flujo como síntesis de las diferentes etapas y su interrelación mostrado en la **Figura 4.1**.

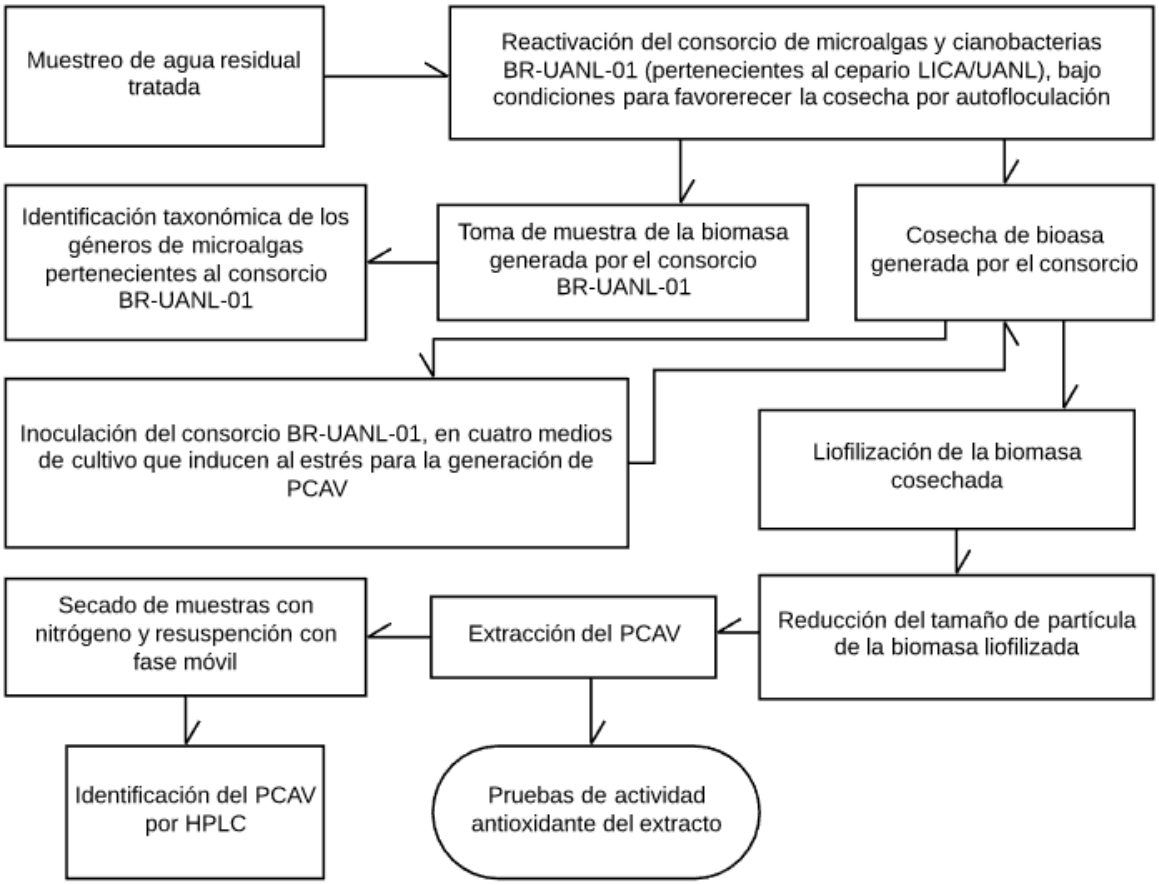


Fig. 4.1 Plan de trabajo de la investigación

4.4 REACTIVACIÓN DEL CONSORCIO DE MICROALGAS BR-UANL-01

El consorcio de microalgas fue reactivado en agua residual tratada proveniente de una cisterna que se alimenta de la red de agua tratada de Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey (SADM) y se utiliza para proporcionar agua a la red de riego de áreas verdes de la UANL. Reportes oficiales del SADM avalan que el efluente de agua residual cumple con la NOM-001-SEMARNAT-1996 al momento de la descarga del efluente tratado. Las

características fisicoquímicas previas a la descarga del Agua Residual Tratada (EST) son mostradas en el **Tabla 4.1.**

Tabla 4.1: Parámetros fisicoquímicos del Efluente Secundario Tratado (EST), utilizada como medio de cultivo

Parámetro	*Concentración*
pH	7.23 ± 0.01
Conductividad Eléctrica	133.30 ± 0.20
Carbono orgánico total	18.28 ± 0.22
NT	17.33 ± 0.83
N-orgánico	3.67
NO_2^-N	0.03 ± 0.00
NO_3^-N	13.40 ± 0.07
NH_4^+-N	0.23 ± 0.02
PO_4^{3-}P	2.29 ± 0.03
Na^+	330.43 ± 0.73
K^+	32.46 ± 0.09
Ca^{2+}	104.46 ± 0.61
Mg^{2+}	21.01 ± 0.03
Fe^{2+}/Fe^{3+}	4.53 ± 0.001

Todos los valores se expresan en mg/L excepto unidades de pH y conductividad eléctrica (mS/m)

Se utilizaron recipientes PET trasparentes, como fotobiorreactores (capacidad de 1 L, diámetro interior de 10 cm y altura 14 cm). Para proporcionar CO_2 atmosférico y agitación suave, los fotobiorreactores fueron aireados, introduciendo una manguera de silicón a una altura de 3 cm de la base, conectada a una bomba de acuario marca ELITE 802, que suministró 0.5 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto), utilizando aire previamente filtrado a 0.45 μm (Millipore Millex-HV). Se siguió la metodología utilizada por Beltrán-Rocha, 2017 para la determinación de la concentración de la biomasa a inocular en los fotobiorreactores. La cuantificación de la biomasa del consorcio BR-UANL-01 se

realizó en peso seco utilizando una estufa de convección Quincy Lab. Inc. 40GL. El procedimiento constó en la toma de un volumen de 5mL y colocados en cápsulas de porcelana previamente llevadas a peso constante por 48h a 70°C. El peso seco se calculó mediante la diferencia del peso inicial de las cápsulas y el peso final (peso de las cápsulas y células del consorcio) posterior al secado por 48h a 70°C. El **Tabla 4.2** señala las condiciones de reactivación del consorcio BR-UANL-01

Tabla 4.2: Condiciones de operación de fotobiorreactores para la activación del consorcio

Parámetro	*Valor*
Fotoperiodo	16:8 Luz: Oscuridad
Flujo de fotones	44 µmoles $m^{-2}s^{-1}$
Inóculo	5 mL (1% en volumen) con aproximadamente 0.025 g (BS) / mL
Volumen	500 mL

4.4.1 Monitoreo de pH

Durante la operación del sistema de fotobiorreactores tanto de la fase de reactivación como de la fase de inducción de estrés, se llevó a cabo un monitoreo de pH en el medio, utilizando un potenciómetro marca HANNA Instruments INC. Posteriormente se realizó un análisis de varianza de dichos datos.

4.4.2 Monitoreo de PO_4^{3-}

Se monitoreó la concentración de fosfatos en el agua de los fotobiorreactores, esto se hizo a través de un kit de fosfatos marca API Aquarium. El cual se basa en la reacción del contenido en la muestra como ortofosfato con el ácido molíbdico para formar el ácido 12 molibdofosfórico acorde con la reacción:

$$H_3PO_4 + 12\ (NH_4)_2MoO_4 + 21\ H^+ \leftrightarrow (NH_4)_3PO_4 \bullet 12\ MoO_3 + 21\ NH_4^+ + 12\ H_2O$$

El ácido 12-molibdofosfórico es reducido por el cloruro de estaño a azul de molibdeno la intensidad del color azul formado depende de la concentración de fosfatos en la muestra. Se cuantificaron los datos por medio de un espectrofotómetro marca Spectronic Genesis 5, se realizó la curva de calibración y se leyó a una longitud de onda de 570 nm, posteriormente se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos.

4.3.1 Cosecha de biomasa microalgal

La cosecha de la biomasa se realizó después de 20 días. Se retiró la aireación de los fotobiorreactores y dejando sedimentar la biomasa aproximadamente entre 15 - 20 min, posteriormente se decantó el agua y se recuperó la biomasa en tubos falcon de 50 mL.

4.5 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROALGAS

La metodología seguida para realizar la identificación taxonómica del consorcio BR-UANL-01 se describe a continuación. Se tomó una muestra sedimentada de biomasa con una pipeta Pasteur la cual se colocó en un portaobjetos para ser observado en un microscopio marca Swift MICAPSA. Para realizar esta prueba los flóculos de biomasa se disgregaron de forma manual apoyados con la pipeta Pasteur. Posteriormente, se agregó una gota de Lugol como indicador para apreciar mejor los cloroplastos de las células de biomasa. Se utilizaron los objetivos 10x, 40x y 100x para realizar una bitácora fotográfica de las microalgas que forman parte del consorcio BR-UANL-01. Posteriormente se compararon las morfologías observadas con las claves taxonómicas propuestas por Freshwater Algae of North America (Wher *et al.* 2015) y la base de datos AlgaeBase, para corroborar los géneros encontrados.

4.6 PRUEBAS DE INDUCCIÓN DE ESTRÉS PARA LA GENERACIÓN DE PIGMENTOS

La inducción de estrés fue realizada para cumplir tres objetivos principales, el primero que la acumulación de pigmentos intracelulares fuera significativa, segundo, que la adición de especies químicas no incrementara el costo del proceso, y tercero no afectar la calidad del

medio de cultivo (EST) el cual por definición cumple con la norma la NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996. Por estas razones, se decidió trabajar con estrés por exceso de fotones y estrés por aumento en la salinidad, los cuales son causantes de daños oxidativos en la célula microalgal. Este tipo de estrés repercute directamente en el aumento de la síntesis de carotenoides, los cuales actúan como estabilizadores de radicales libres y antioxidantes, protegiendo los fotosistemas del daño oxidativo (Sandesh Kamath *et al.* 2008; Chen *et al.* 2017).

Los recipientes utilizados como fotobiorreactores son descritos en la sección 4.4. Se probaron cuatro condiciones de inducción de pigmentos a partir de estrés químico y físico, las cuales fueron:

1. Exceso de Fotones 24h luz (Chen *et al.,* 2017)
2. Acetato de sodio 2% (Chen *et al.,* 2017)
3. NaCl 0.8% (Chokshi *et al.,* 2017)
4. NaCl 0.18% / Acetato de sodio 0.49% (Vidhyavathi *et al.,* 2008)

Las condiciones de operación de los fotobiorreactores son mostradas en el **Tabla 4.3.**

Tabla 4.3 Condiciones de operación de fotobiorreactores, con condiciones de inducción de generación de pigmentos a partir de estrés

Parámetro	**Valor**	
Tiempo de operación	25 días	
Inóculo de consorcio BR-UANL-01	5 mL (1% en volumen) 0.025 g (BS) / mL	
Volumen	500 mL	
Lote	**L1**	**L2, L3 y L4**
Fotoperiodos	24h Luz	16:8 Luz: Oscuridad
Fuente de luz	18:6; LED: Solar	LED
Flujo de fotones	1270 µmoles $m^{-2}s^{-1}$	44 µmoles $m^{-2}s^{-1}$

4.7 LIOFILIZACIÓN DE BIOMASA

La biomasa microalgal generada del proceso 4.6, se liofilizó para posteriormente realizar las pruebas de extracción mediante el procedimiento descrito a continuación. Se cosechó la biomasa como se indica en el inciso 4.4.1 y posteriormente, se vertió el contenido de los tubos falcon en frascos para liofilizadora, la muestra se congeló a -20°C durante 12 h, después los frascos fueron conectados al equipo de liofilización, dónde se extrajo la humedad de las muestras a -50 °C con un vacío de entre 0.900 a 0.800 mBar, tras 24 h aproximadamente, los frascos fueron retirados recuperando la biomasa liofilizada en tubos falcon de 50 mL.

4.8 PRUEBAS DE EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS

Se utilizaron dos métodos de extracción de carotenoides en biomasa microalgal, extracción sólido-líquido (Bligh y Dyer, 1959) con biomasa húmeda y extracción asistida con ultrasonido (Macías-Sánchez *et al.*, 2009) con biomasa liofilizada, en ambos métodos se utilizó tanto la biomasa no estresada (NE) como la biomasa estresada (E), con el fin de comparar la concentración de luteína. Las extracciones mediante estas técnicas fueron realizadas por triplicado. Antes de realizar las pruebas, se redujo el tamaño de partícula de la biomasa liofilizada con un mortero convencional, con la finalidad de facilitar la extracción de los pigmentos y su dilución por los solventes.

4.8.1 Extracción sólido-líquido

Se llevó a cabo una extracción sólido-líquido, el método es descrito a continuación: se agregó cloroformo: metanol: agua en una relación (2:2:1.8 *V/V*) en volumen, en frascos de vidrio, seguido de 0.025 g aproximadamente de biomasa liofilizada, se agitó vigorosamente y se purgó el frasco para liberar los vapores de los solventes, se dejó reposar durante 24 h en ausencia de luz dado que este compuesto es fotosensible, posteriormente se recuperó la fase inferior que contiene cloroformo y los pigmentos carotenoides.

4.8.2 Extracción asistida con ultrasonido

Se llevó a cabo el método reportado por Macías-Sánchez *et al*., (2009), se usó metanol como solvente en la extracción, la técnica es descrita a continuación: en un tubo eppendorf de 2.5 mL se colocó 0.025 g de biomasa liofilizada, y 1.2 mL del solvente. Posteriormente se sonicó la mezcla, mediante de un sonicador marca Fisherbrand™ Q500 con sonda, a una amplitud de 80% durante 3 min con pulsos de 15 s, en intervalos de reposo de 1 min en baño de hielo. Se recuperó el sobrenadante en tubos eppendorf y se repitió el proceso de sonicación hasta que el solvente fuera incoloro. El sobrenadante recuperado se dejó en incubación a 4°C en ausencia de luz durante 24 h. Pasado este tiempo el extracto se separó de los restos celulares por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min a 4°C.

4.9 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Para purificar y preconcentrar la muestra se realizó una separación cromatográfica en columna empacada con sílica gel, de aproximadamente 30 mm × 5mm la fase móvil fue de hexano: etil acetato 70:30 *V/V*.

Para la identificación y cuantificación de la luteína se realizó un análisis cromatográfico con un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (Young Lin YL9300) con detector UV. La separación se llevó a cabo usando una columna SiliaChrom SB-C18 (3 µm × 4.6 mm × 150 mm) a 30 °C. La fase móvil constó de metanol: acetonitrilo (90:10 *V/V*). Los extractos fueron eluídos a un flujo de 1.5 mL/min, la luteína fue detectada a una longitud de onda entre 444-475 nm. La curva de calibración fue realizada con un estándar farmacéutico secundario de luteína, marca SIGMA ALDRICH.

La concentración de luteína para cada muestra fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$Concentración\ de\ Luteína\ \left(\frac{mg}{gPS}\right) = \frac{A*V}{W} \qquad Ecuación\ 1$$

Siendo A la concentración de luteína en la muestra comparada con la curva de calibración (mg/L), V el volumen de la solución (L) y W el peso de la biomasa (g).

4.10 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

Se realizó una prueba para conocer la actividad antioxidante de los extractos obtenidos. Fue llevada a cabo a la técnica de ABTS, con el objetivo de medir capacidad de inhibir la oxidación de una molécula.

4.10.1 Actividad antioxidante por el radical ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$)

En este ensayo lo que se analiza es la capacidad del extracto para donar hidrógenos, disminuyendo el espectro de absorción del catión de la molécula de ABTS regresándolo a su forma neutra.

Se preparó una solución acuosa de ABTS a una concentración 7 mM. De igual manera, se preparó una solución de persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$) a una concentración de 2.45 mM, posteriormente fueron mezcladas ambas soluciones en proporción 2:1 respectivamente y se dejó oxidar la mezcla por 12 horas antes de ser utilizada. Se diluyó la solución con etanol hasta obtener una absorbancia de 0.700 ± 0.002 nm, posteriormente a 50 µL de la muestra se agregaron 950 µL del reactivo del $ABTS^{\bullet}$ ajustado, el control consta de la mezcla de reactivos sin el extracto posteriormente se leyó a 734 nm en un espectrofotómetro marca Spectronic Genesis 5.

La capacidad de inhibición fue calculada con la ecuación 2, los resultados fueron expresados como micromoles equivalentes de trolox por cada gramo de peso seco (µmolET g^{-1}PS).

$$Inhibición\ (\%) = \frac{Absorbancia\ control - Absorbancia\ muestra}{Absorbancia\ control} \times 100 \quad Ecuación\ 2$$

4.10.2 Actividad Antioxidante por el método del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

La capacidad de los extractos para transferir electrones fue medida con la técnica de reducción de hierro (FRAP), se agregaron 5 µL de cada muestra en 12 µL de buffer de fosfato

(pH 7), el cual fue preparado previamente. Posteriormente, se agregaron a la mezcla 22 µL de ferrocianuro de potasio al 1%, se homogeneizaron y se incubaron en un baño de agua caliente a 50ºC durante 20 minutos. Después de enfriarse, se agregaron 12 µL de ácido tricloroacético al 10%. A continuación, se agregaron 45 µL de agua destilada y 10 µL de cloruro férrico al 0,1% y fueron agitados vigorosamente. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 700 nm con un lector de microplacas marca Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader, BioTek Instruments, USA. Finalmente, los resultados se reportaron como equivalentes de ácido gálico en miligramos por gramo (mg GAE g^{-1}) de materia prima.

CAPÍTULO V
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 REACTIVACIÓN DEL CONSORCIO MICROALGAL BR-UANL-01 Y EFECTOS EN EL pH DEL MEDIO

Las microalgas al ser microorganismos muy versátiles tienen la capacidad de adaptarse a condiciones adversas aprovechando principalmente el CO_2 como fuente de carbono, así como el nitrógeno y fósforo inorgánico existente en aguas contaminadas para la generación de biomasa (Singh y Patel, 2012). Es por esto, que el consorcio BR-UANL-01 fue inoculado en un efluente secundario tratado (EST), con la metodología implementada por Beltrán-Rocha para inducir a la autofloculación de dicho consorcio. Una de las ventajas de utilizar EST como medio de cultivo, es la presencia de nutrientes inorgánicos tales como NO_2^-, NO_3^-, NH_4^+ y PO_4^{3-} (Rasoul-Amini *et al.,*2014; Beltrán-Rocha *et al.,* 2017), los cuales son necesarios para el crecimiento de estos microorganismos y la obtención de biomasa con un alto contenido de productos intracelulares (Lohrey y Kochergin, 2012). Durante la etapa de reactivación, se monitoreo el pH, obteniendo los datos mostrados en la **Figura 5.1.**

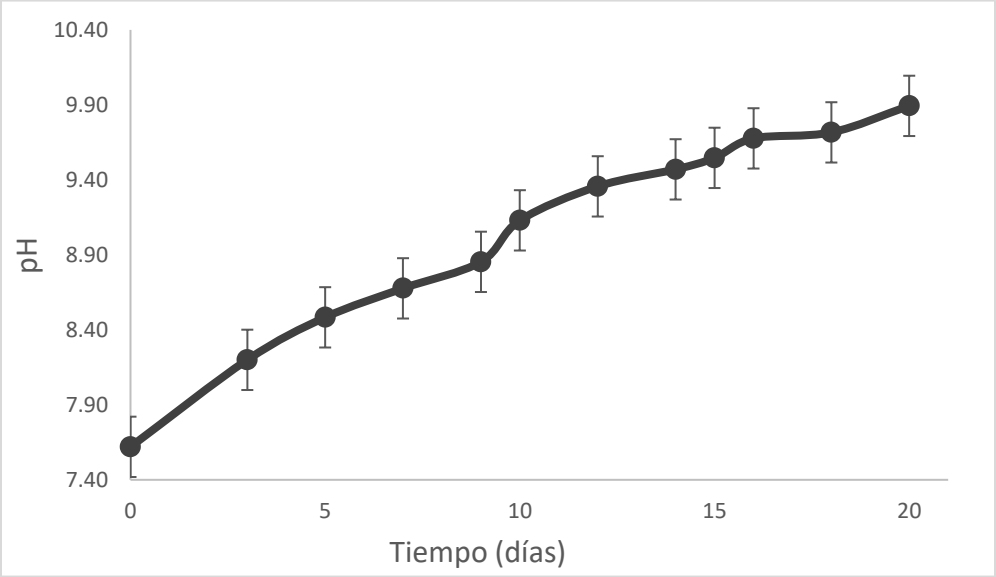


Figura 5.1. Valores de pH durante la reactivación del consorcio BR-UANL-01. condiciones de operación: fotoperiodos de 18:6 Luz: Oscuridad, flujo de fotones de 44 µmoles $m^{-2}s^{-1}$, 500 mL de EST durante 20 días (n=3)

Los resultados de la reactivación del consorcio BR-UANL-01 registraron valores de promedio pH inicial de 7.6 y final de 9.8 en un tiempo de cultivo de 20 días. Estos resultados son similares a los obtenidos por Sacristán de Alva *et al.* (2013), quienes registraron pH alcalino en el medio de crecimiento, con valores iniciales de 8.3 y finales de 9.3 en aguas residuales municipales tras un periodo de 15 días, esto en un cultivo de *Scenedesmus acutus*, indicando que este género de microalga es capaz de alcalinizar el medio por acción metabólica debido principalmente por el consumo del CO_2 y la asimilación del NO_3^-.

Por otro lado, Renuka *et al*., (2013), manifestaron valores mayores a los obtenidos en esta investigación, en un menor tiempo, pasando el pH de un valor inicial de 8.2 a uno final de 10.2, 48 horas después de la inoculación del consorcio de microalgas en aguas residuales. Cabe destacar que la carga de nutrientes fue mayor a la utilizada en la presente investigación, ya que dichos autores utilizaron agua previa al proceso de tratamiento. No obstante, el incremento de unidades de pH fue muy similar aproximadamente 2 unidades en cada investigación. En ambos casos la actividad fotosintética representa un papel determinante, para la remoción de diferentes formas de N y P presentes en este tipo de aguas, siendo que se ha reportado que la actividad fotosintética aumenta en pH básicos (Andrade y Costa 2007).

En la investigación realizada por Koreivienė, *et al.,* (2014), se obtuvieron valores de pH iniciales de 7.74 y finales de 10.2 al inocular en agua residual un consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*, géneros también presentes en el consorcio BR-UANL-01, por lo que el aumento del pH en el medio de cultivo se puede asociar al uso de NO_3^- como fuente de nitrógeno, debido a que el consumo de NO_3^- produce equivalentemente 1 mol de OH^- (Rashid *et al*., 2014). De igual forma, la asimilación de HCO_3^-, que al disociarse en CO_2 causa la liberación de OH^- incrementando el potencial de hidrógeno, dotando de carbono necesario a los microorganismos para el incremento de biomasa (Martínez *et al.,* 2000). Además, se ha reportado el agotamiento y consumo de CO_2 y HCO_3^- causado por microalgas contribuye al aumento del pH del medio de crecimiento, pudiendo llegar a tener valores superiores a 11 (Heubeck *et al*., 2007; Park y Craggs 2010).

El aumento de pH en el medio de crecimiento está relacionado directamente con la actividad metabólica del consorcio, debido a que algunos organismos fotosintéticos tienden a alcalinizan el medio de crecimiento tras la metabolización de los nutrientes y al fijar el CO_2, (Franchino *et al.,*2013; Beltrán-Rocha *et al.,* 2017; Gonçalves, Pires y Simões, 2017),

5.2 IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CONSORCIO BR-UANL-01

La identificación taxonómica a nivel género se realizó de acuerdo con Freshwater Algae of North America, Ecology and Classification (Wher, Sheath y Kociolek,2015) apoyados de igual manera con diferentes bases de datos como AlgaeBase (Guiry y Guiry, 2018) y Soft-Bodied Stream Algae of California, 2018.

En la vista al microscopio del flóculo del consorcio BR-UANL-01 mostrado en la **Figura 5.2**, se pudieron apreciar regiones filamentosas, colonias y cenobios adheridos a los filamentos, así como regiones traslúcidas y mucilaginosas.

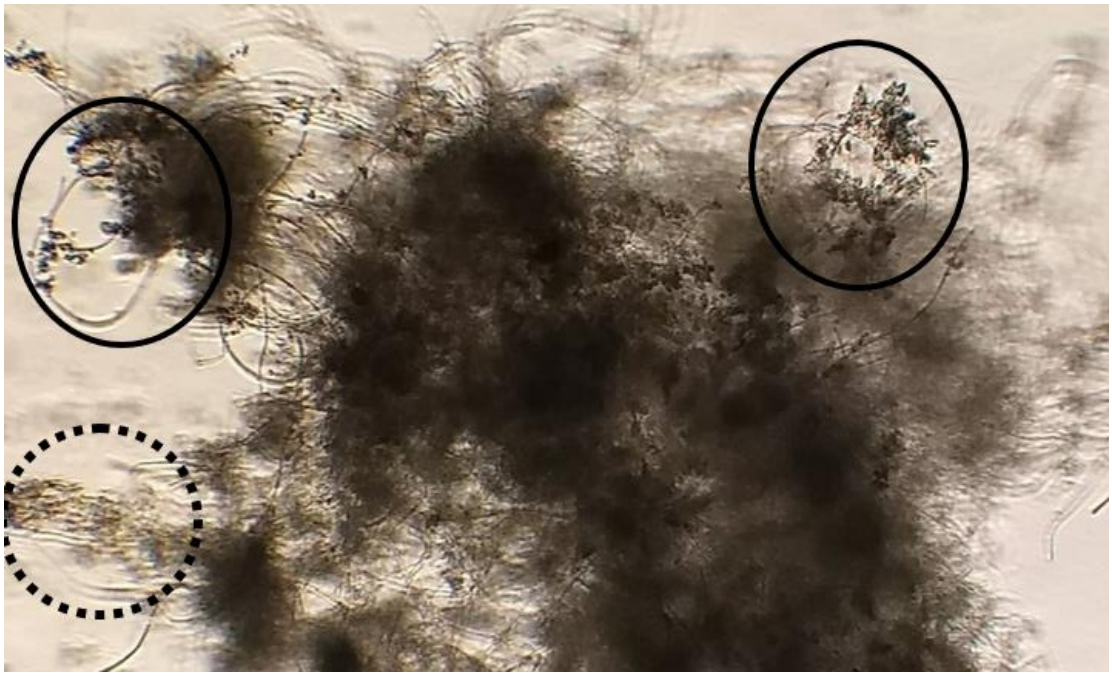


Figura 5.2 Flóculo del consorcio BR-UANL-01, visto en microscopio a 10x, se aprecian filamentos, regiones con cenobios adheridos a los filamentos encerrados en círculos negros, así como zonas mucilaginosas encerradas en círculos punteados.

Imagen: Edwin A. Fariz Salinas

La disgregación del flóculo se realizó manualmente con ayuda de una pipeta Pasteur, para posteriormente realizar la observación al microscopio. Se registró el predominio de dos géneros de microalgas y dos géneros de cianobacterias las cuales son capaces de generar pigmentos intracelulares, éstas son mostradas en la **Figura 5.3**

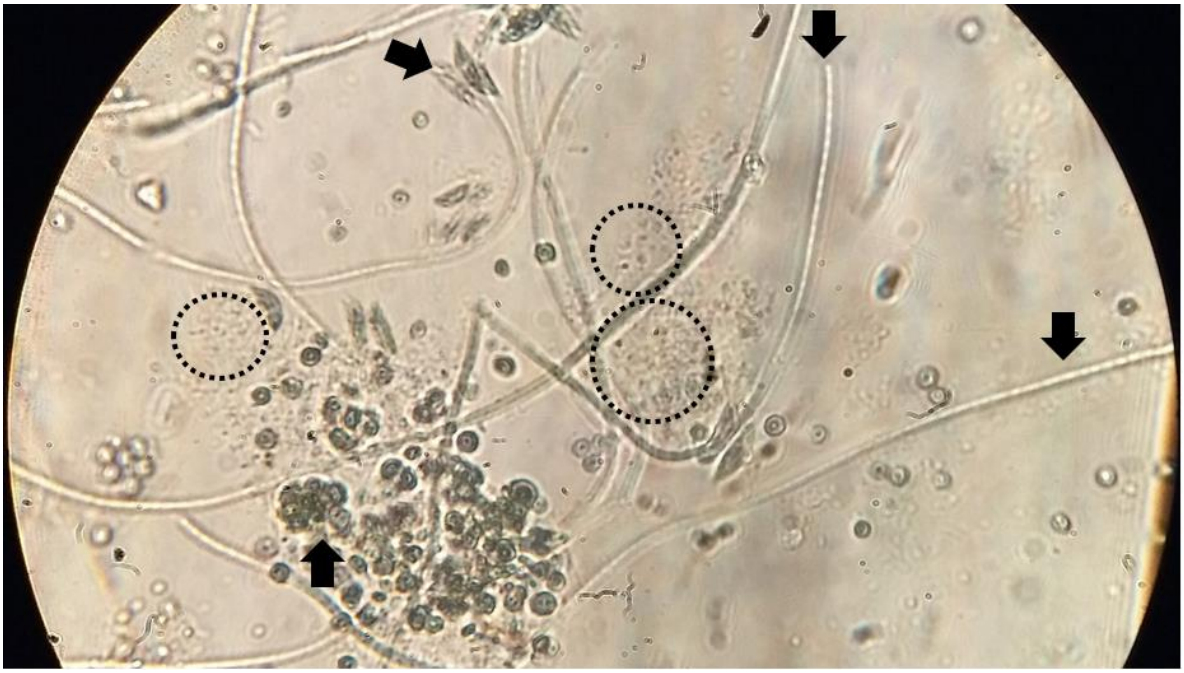


Figura 5.3 Vista microscópica general del flóculo disgregado y de las especies que conforman el consorcio BR-UANL-01 a 40x. Se observan los géneros de microalgas y cianobacterias dominantes: *Chlorella spp,* flechas ascendentes. *Scenedesmus spp.* flechas diagonales, *Leptolyngbya spp* flechas descendentes y *Microcystis spp* círculos.

Imagen: Edwin A. Fariz Salinas

5.2.1 *Scenedesmus spp.*

Orden: Sphaeropleales

Familia: Scenedesmaceae

Subfamilia: Scenedesmoidea

Esta microalga tiende a formar colonias de 2/4/8/16 hasta 32 células planas paralelas a lo largo de la pared celular. Puede presentar espinas curvas en los extremos de las células. Tienen una forma elipsoidal, ovoide o en forma de crestas, además contiene un cloroplasto

parietal, posee pirenoide y no son móviles ni filamentosas (Wher *et al.,* 2015), esta microalga mostrada en la **Figura 5.4**.

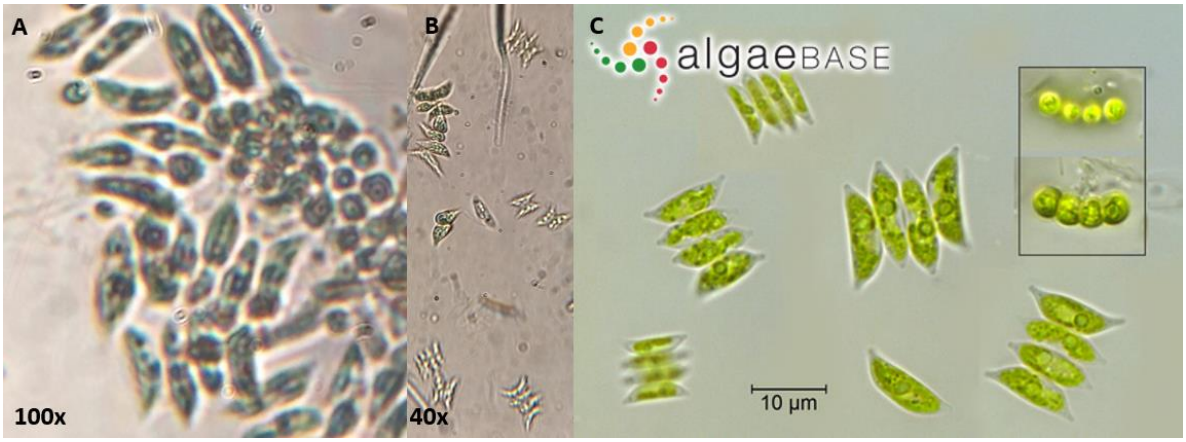


Fig. 5.4. A) y B); *Scenedesmus spp.* presente en el consorcio BR-UANL-01. Observadas a 100x y 40x. C) *Scenedesmus dimorphus* algaeBase, 2019

Imagen A y B: Edwin A. Fariz Salinas; C por Carter, (2018)

Este género puede habitar en ríos, estanques y lagos, además es usual encontrarlas en aguas ricas en nutrientes, especialmente aquellas que contienen altas concentraciones de nitrógeno inorgánico, esta microalga es capaz de generar productos comerciales de alto valor como: ácidos grasos poliinsaturados, lípidos, proteínas y almidón (Borowitzka, 2013; Minhas *et al.,* 2016), así como también ciertos carotenoides como la astaxantina (Orosa *et al.,*2000; Pirastru *et al.,* 2011); y luteína (Orosa *et al.,*2000; Sánchez *et al.,* 2008; Xin *et al.,*2011, Chan *et al.,*2013; Borowitzka, 2013; Hu, 2019).

5.2.2 *Chlorella spp.*

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Esta microalga se caracteriza por presentar células esféricas, ovoides o elipsoidales, tienen a ser solitarias o en ocasiones se pueden encontrar formando colonias de hasta 64 individuos. El cloroplasto es en forma de copa o de plato, con o sin pirenoides, rodeado de gránulos de almidón, además de que no presenta un flagelo (Wher *et al.,* 2015), esta microalga observa en la **Figura 5.5**.

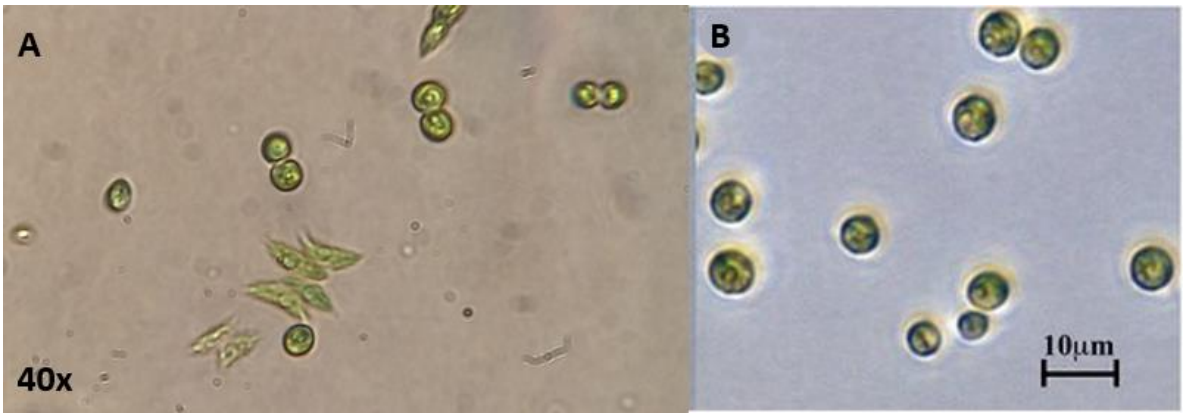


Figura 5.5 A) *Chlorella spp.* presente en el consorcio BR-UANL-01, observada a 40x. B) *Chlorella vulgaris* Chioccioli *et al.,* (2014).

Imagen: A) por Edwin A. Fariz Salinas; B) por Chioccioli *et al.,* (2014)

Habitan tanto aguas dulces como saladas; pudiendo llegar a ser encontradas en el suelo y hábitats subaéreos, plantónicas, edáficas o endosimbióticas. Este es uno de los géneros de microalgas más estudiados y socorridos para la generación de biocombustibles ya que tiene la capacidad de producir y acumular almidón, ácidos grasos poliinsaturados y lípidos (Liang, Sarkany y Cui, 2009; Borowitzka, 2013), además de poder generar ciertos carotenoides como astaxantina (Kim *et al*., 2016; Gong y Bassi, 2016) y luteína (Borowitzka, 2013; Chen *et al.,*2019; Hu *et al.,*2018; Hu, 2019), en condiciones de estrés ambiental.

5.2.3 *Microcystis spp.*

Orden: Chroococcales

Familia: Microcystaceae

Presenta colonias irregulares, micro o macroscópicas, de flotación libre, esféricas, ovoides, con células dispuestas de forma irregular o escasa, a menudo compuestas de subcolonias o agrupadas, con presencia de mucílago, el cual es fino, incoloro y difuso. Las células son esféricas o semiesféricas después de la división, de entre 0.8 a 6 µm de diámetro de color azul verdoso, gris o amarillo con vesículas de gas. Es uno de los géneros más abundantes, y puede ser encontrada formando parte del plancton de agua dulce, así como

también en aguas de reservorios eutróficos (Wher *et al.,* 2015), cianobacteria mostrada en la **Figura 5.6**.

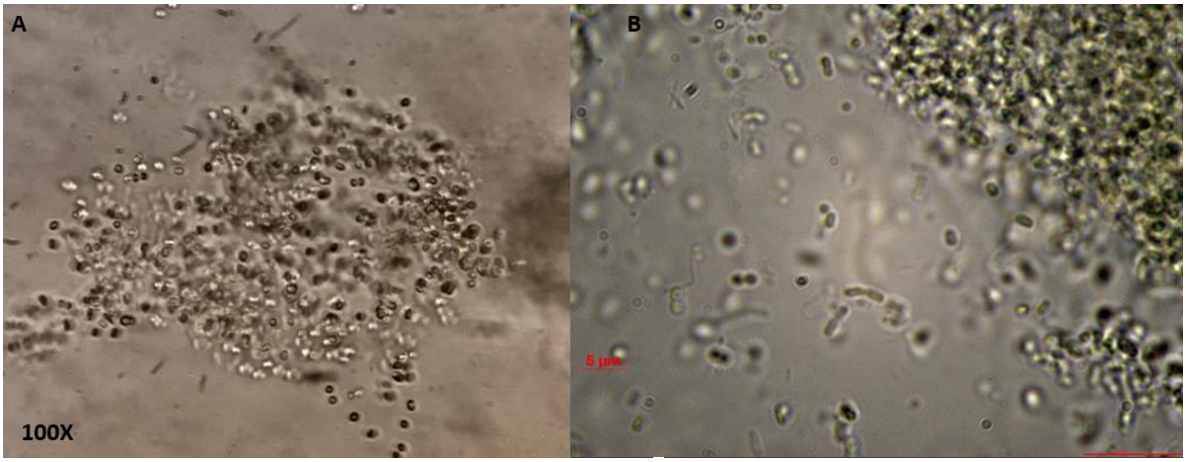


Fig. 5.6 A) *Microcystis spp.* presente en el consorcio BR-UANL-01. Observada a 100x B) *Microcystis spp.* Namzaraev, 2010

Imagen: A) por Edwin A. Fariz Salinas; B) por Namzaraev, 2010

Es una de las cianobacterias más comunes, causante de la eutrofización en cuerpos de agua. También es uno de los géneros más estudiados debido a que algunas cepas son capaces de producir microcistina, un grupo de péptidos hepatotóxicos muy potentes, los cuales pueden ser empleados a nivel farmacéutico (Codd *et al.,* 2005; Vijayakumar y Menakha, 2015). Sin embargo, se ha demostrado que a pH alcalinos (8 a 9.5), su toxicidad disminuye (Van der Westhuizen y Eloff, 1983; Song *et al.,* 1998). Esta representa un aspecto benéfico en la presente investigación ya que los rangos de pH de crecimiento del consorcio van desde 7.8 a 9.6, es decir dentro de los rangos no tóxicos. Además, también se ha registrado la disminución de producción de microcistina en condiciones de crecimiento con exceso de fotones (Watanabe y Oishi, 1985), en cultivos arriba de 28 °C (Gorham 1964; Van der Westhuizen y Eloff, 1983) y por lo tanto las condiciones de operación de los fotobiorreactores en esta investigación, no son las condiciones en las que podría haber producción de microcistina.

5.2.4 *Leptolyngbya spp.*

Orden: Synechococcales

Familia: Leptolyngbyaceae

Los filamentos que esta cianobacteria presenta son rara vez solitarios, usualmente están dispuestos en racimo o tapetes. Además, poseen flotación libre o se unen a sustratos, rara vez en fascículos o formando colonias compactas (talo). Sus vainas son, hialinas, finas y firmes. La ramificación es poco común, no obstante, pueden presentarse pseudo-ramificaciones. Los tricomas son de 0.5-3.5 µm de ancho móviles o no. Así mismo, presenta células cilíndricas, usualmente más largas que anchas que con muy poca frecuencia pueden ser isodiametricas[6]. Este género de cianobacteria puede estar presente en ambientes de agua dulce o salada, así como también en suelos (Wher *et al.,* 2015) cianobacteria mostrada en **Figura 5.7**.

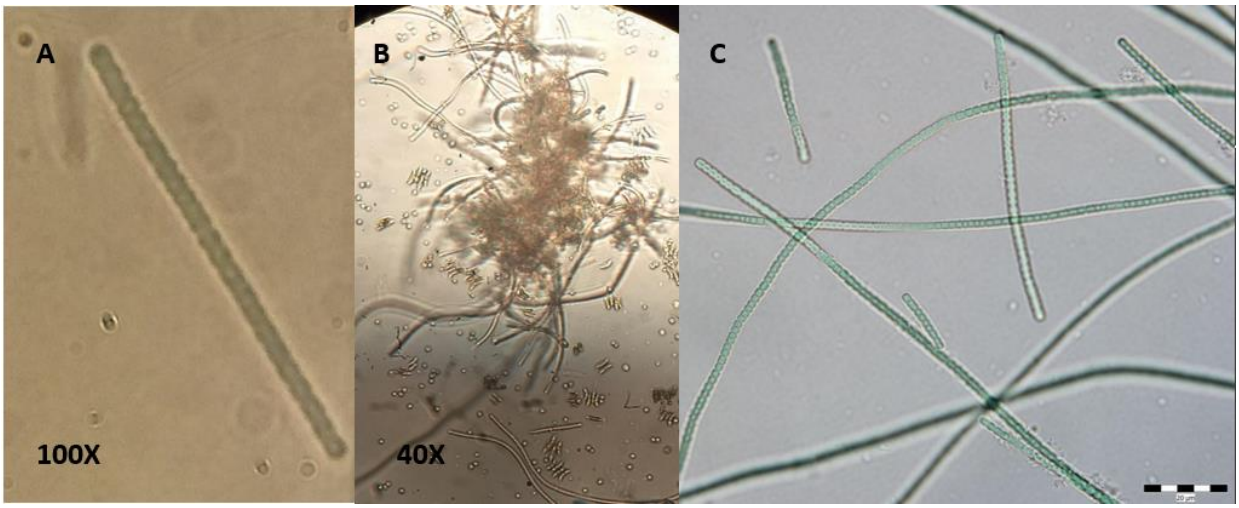


Figura 5.7 *Leptolyngbya sp.* presente en el consorcio BR-UANL-01, A) 100x y B) 40x. C) *Leptolyngbya boryana* Algaebase, 2019

Imagen: A y B por Edwin A. Fariz Salinas; C) por AlgaeBase, 2019

Este género de cianobacteria es capaz de acumular ácidos grasos que pueden ser útiles para la generación de biocombustibles, además de poder fijar nitrógeno y fósforo de las aguas

[6] Células que presentan varias caras y todas ellas son iguales entre sí.

contaminadas con exceso de nutrientes (Borowitzka, 2013; Tsolcha et al.,2017). Así mismo pueden ser obtenidos productos con actividad antioxidante y exopolisacáridos con fines terapéuticos (Bellezza *et al*., 2003; Vijayakumar y Menakha, 2015; Trabelsi *et al*.,2016).

5.3 OBTENCIÓN DE PIGMENTOS A PARTIR DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS

La biomasa obtenida en la fase de reactivación fue cosechada y posteriormente inoculada nuevamente en EST, donde, se modificaron algunos parámetros para inducir el estrés en el consorcio BR-UANL-01 (**Tabla 4.3**), con la finalidad de incrementar la concentración de luteína en las células. Cabe resaltar que durante esta fase el consorcio presentó crecimiento ya que la biomasa final se incrementó durante los ensayos.

Los lotes 1, 2 y 3 (exceso de luz, acetato de sodio al 2% y NaCl 0.8% respectivamente) mostraron cambios de coloración en la biomasa en el caso del lote 1 y 2 se tornaron amarillos y en el caso del lote tres presentó una coloración café rojiza (**Figura 5.8**), no obstante, el tratamiento del lote 4 (Acetato de sodio 0.18% / NaCl 0.49%) no indujo algún cambio notorio en la coloración del consorcio BR-UANL-01, esto debido a que de acuerdo con Vidhyavathi, 2008, aunado a la adición de la mezcla de sales son requeridos fotoperiodos de 24h con un flujo de fotones mínimo de 30 µmoles/m^2/s con la finalidad de aumentar la síntesis de carotenoides, al utilizar fotoperiodos de iluminación más cortos (16:8 h, luz: oscuridad) dicha síntesis pudo verse afectada a pesar de utilizar un fujo de fotones mayor (44 µmoles/m^2/s).

De acuerdo con Borowitzka (1991), los pigmentos tienden a incrementar intracelularmente cerca de los fotosistemas como respuesta al estrés ambiental impuesto para evitar el daño por la exposición a dichas condiciones, por lo cual un cambio en la coloración está asociado con la acumulación de pigmentos intracelulares (Zlotnik *et al.,*1993; Hagen *et al.,* 2000; Pirastru *et al.,* 2011).

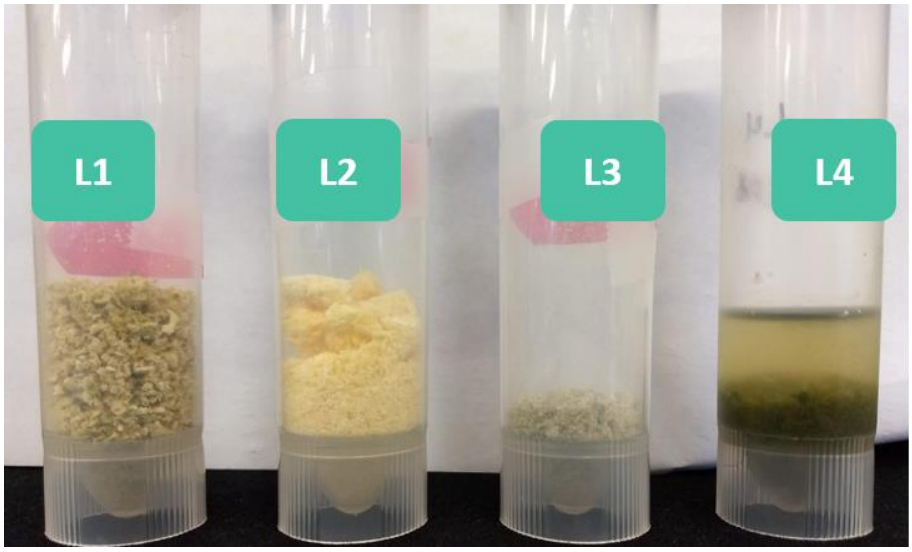


Fig. 5.8 Biomasa liofilizada del consorcio BR-UANL-01 después de ser sometidos a estrés ambiental para aumentar la producción de pigmentos bajo distintos tratamientos, L1: Exceso de luz, L2: Acetato de sodio 2% y L3: NaCl 0.8%, al no ver cambio en la coloración de la biomasa se decidió no liofilizar L4: NaCl 0.18% / Acetato de sodio 0.49%.

Cuando las microalgas están bajo estrés celular, este pigmento puede transformarse y pasar de ser un metabolito primario a un metabolito secundario para el crecimiento y mantenimiento de la biomasa (del Campo *et al.,* 2004; Xie *et al.,* 2014). Se ha demostrado que existe una mayor síntesis de luteína por microalgas en medios con altas cantidades de nitrógeno (del Rio-Chanona *et al.,*2017), es por esta razón que al utilizar un medio como EST sin limitación de nitrato se presentó una mayor concentración de luteína en la biomasa.

Tanto el pH como la concentración de PO_4^{3-} en el EST de los fotobiorreactores fueron monitoreados durante los ensayos, los valores de pH son mostrados en la **Figura 5.9** un aumento en los valores de este parámetro es indicativo de la actividad fotosintética del consorcio, mientras que la disminución de los PO_4^{3-} mostrado en la **Figura 5.10**, indica el aprovechamiento de este nutriente por parte del consorcio, es decir, ambos parámetros permiten indirectamente estimar el estado de los cultivos estresados.

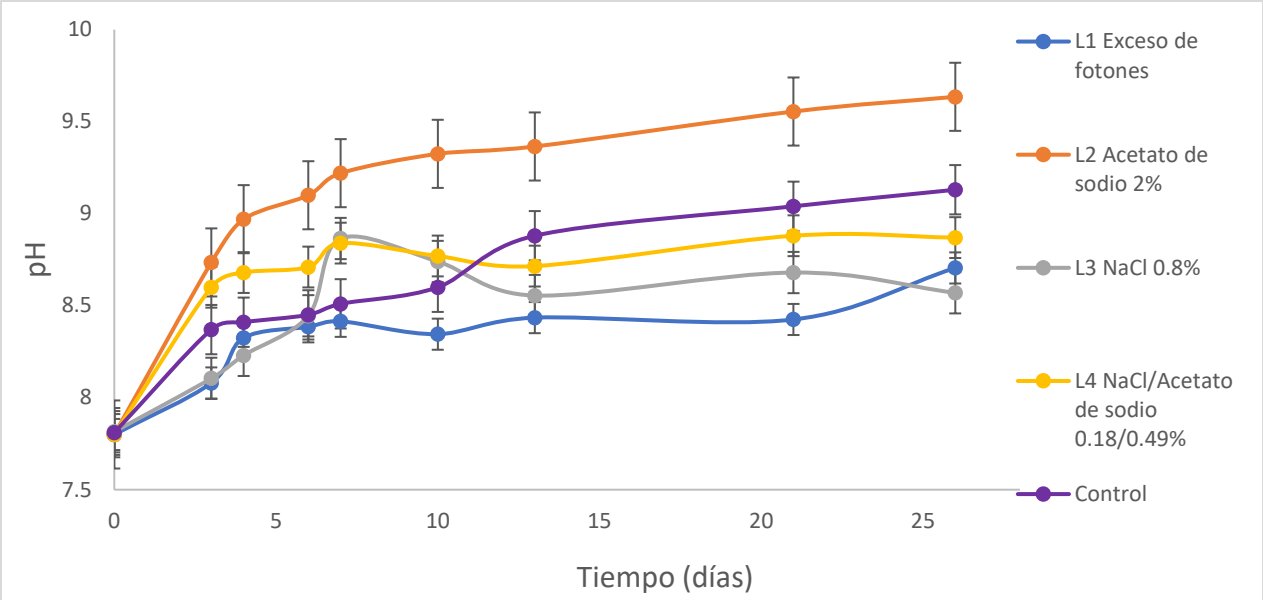


Figura 5.9 Monitoreo del pH en cultivo del consorcio BR-UANL-01 en EST con inducción de estrés mediante diferentes tratamientos.

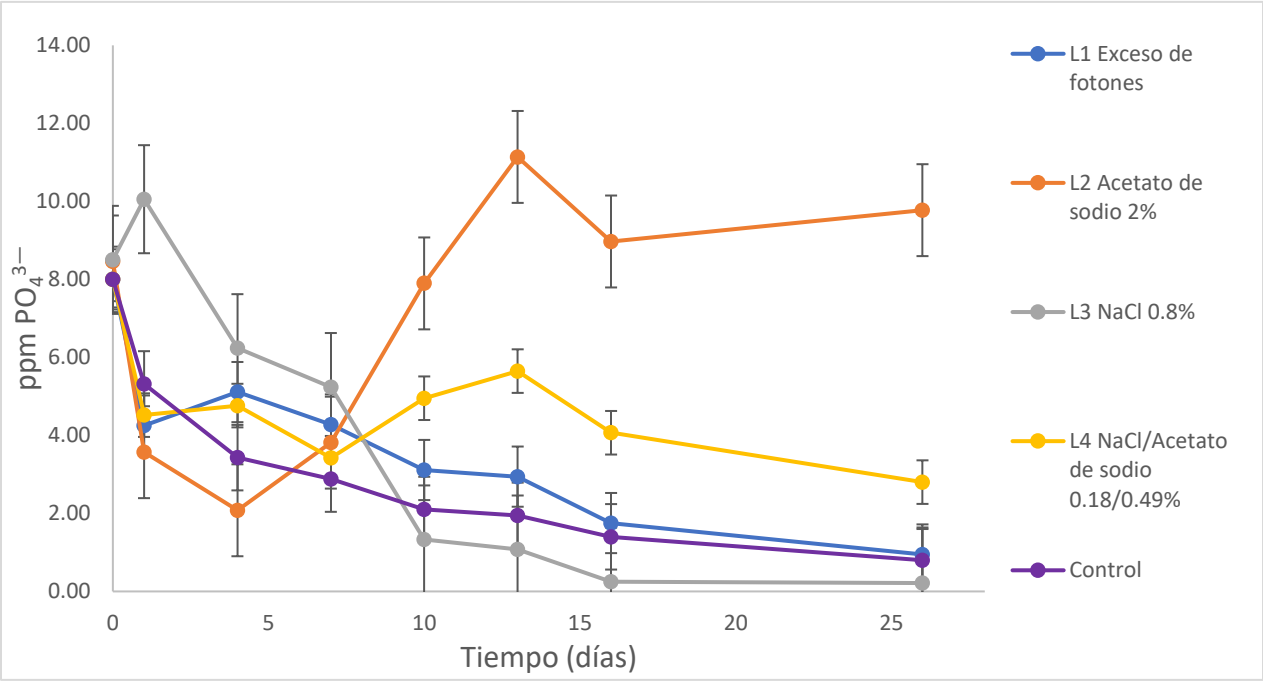


Figura 5.10 Monitoreo de PO_4^{3-} en cultivo del consorcio BR-UANL-01 en EST con inducción de estrés mediante diferentes tratamientos.

El pH en el EST no mostró diferencia significativa ($P < 0.05$), entre el lote 2 y el control, sin embargo, todos incrementaron gradualmente, desde un valor de 7.8 hasta un máximo de 9.6 para el lote 2, por lo que al igual que en el punto 5.1, el aumento de los valores de pH indica un aumento de la actividad metabólica por parte de las células microalgales [el análisis estadístico es mostrado en el **Anexo I**].

El consorcio BR-UANL-01 cultivado en los fotobiorreactores tuvo un efecto positivo en la reducción de PO_4^{3-} (figura 5.10 y Tabla 5.1), alcanzando valores hasta de 0.22 mg/L de PO_4^{3-} para el lote 3 (NaCl 0.8%) en un lapso de 26 días, sin embargo, se observó una tendencia inversa a partir del día 10 en el lote 2, observándose un incremento en la concentración inicial de fosfatos en un 15.55%, el análisis de varianza el cual es mostrado en el **Anexo II** mostró diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto a los demás lotes. Según Powell, 2011 las microalgas que remueven materia orgánica de aguas de desecho tienen la capacidad de almacenar fósforo intracelular de reserva. Hay que recordar que la biomasa fue cultivada previamente en EST, por lo que es probable que el consorcio almacenara fósforo desde la fase de reactivación, es posible que el estrés por acetato de sodio haya dificultado la asimilación de fósforo, causando muerte celular liberando al medio parte del fósforo almacenado. Diversos autores como Corell, 1998, Seale *et al.*, 1987 y Cembella *et al.,* 1982 coinciden en que la asimilación de fósforo se ve afectada por las condiciones ambientales, entre ellas, el incremento de pH, salinidad/fuerza iónica del medio de cultivo y de los iones disponibles como K^+, Na^+ y Mg^+.

Tabla 5.1 Porcentaje de remoción de fosfatos en fotobiorreactores con inducción de estrés

Lote/ Tratamiento	*% de Remoción de fosfatos*	*[PO_4^{3-}] final (mg/L)*
1 Exceso de Fotones 24h	88.15 ± 3.4	0.95 ± 0.24
2 Acetato de sodio 2%	-15.55 ± 10.1	9.77 ± 0.49
3 NaCl 0.8%	97.47 ± 2.4	0.22 ± 0.30
4 NaCl/Acetato de sodio 0.18/0.49%	61.67 ± 3.8	2.80 ± 0.20
Control	90 ± 2.5	0.8 ± 0.33

Los porcentajes de remoción de fosfatos de los lotes 1 y 4 fueron menores a los reportados por Beltrán-Rocha, 2017, debido principalmente al estado de estrés en dichos lotes, lo cual posiblemente fue un factor para retardar la asimilación de este nutriente. Sin embargo, las concentraciones de PO_4^{3-} obtenidas por los lotes 1 y 3 (Tabla 5.1), dieron como resultado el cumplimiento de descargas para sistemas acuáticos sensibles a eutrofización según lo establecido por normas estrictas tal como la Directiva 91/271/CEE que estipula concentraciones menores de 1 mg/L de PT y 10 mg/L de NT para su descarga (Consejo CE, 1991).

En la investigación realizada por De Bhowmick *et al.,* (2019), se obtuvo una remoción del fósforo residual de un 91.6% con *Chlorella minitussima* en varios efluentes residuales, para la obtención de luteína, los resultados obtenidos en esa investigación fueron cercanos a lo obtenido por el lote 1 y menor a lo obtenido por el lote 3. En los trabajos realizados por Nguyen *et al.,* (2018) utilizaron *C. vulgaris* autofloculante para tratar efluentes secundarios, logrando reducir un 83% del fósforo total, y Fernandes *et al.,* (2017) quienes utilizaron *C. sorokiniana* para remover nutrientes en aguas negras removiendo un 81% del fósforo. Estas investigaciones lograron una menor remoción de PO_4^{3-} que la realizada por el consorcio floculante BR-UANL-01 en los lotes con inducción de estrés ambiental 1 y 3.

Con base en los resultados obtenidos, se decidió continuar en las etapas posteriores de la investigación con el lote 1 correspondiente a el estrés por exceso de fotones. Debido a que obtuvo una alta remoción de PO_4^{3-} del 88.15% y los valores máximos de pH alcanzados por el lote están dentro de lo que establece la NOM-001-SEMARNAT-1996 así como el criterio de sustentabilidad, ya que esta biomasa no requiere un pretratamiento / lavado previo a la extracción de pigmentos, ya que no adicionan reactivos al medio, de tal forma, se eliminan los residuos generados y por ende los costos de producción que puedan surgir en un posterior escalamiento, además de ir de la mano con los ODS propuestos por la ONU para 2030.

5.4 EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS INTRACELULARES Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

Tras las pruebas de extracción se lograron recuperar 4mL de extracto en la extracción asistida con ultrasonido, mientras que 2 mL de extracto fueron obtenidos en la extracción sólido-líquido. Dicho extracto fue secado con nitrógeno gas y resuspendido en 4 mL de metanol, para posteriormente analizar dichos extractos con el equipo HPLC. Los resultados del análisis son mostrados en el **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. Resultados del análisis por HPLC de los extractos MeOH muestras extraídas con ultrasonido y ByD extracción sólido líquido; subíndice C no estresada y subíndice E muestra estresada

Muestra	*Tiempo de retención [min]*	*Concentración de Luteína [mg/g]*
$MeOH_C$	5.733	0.076 ± 0.02
$MeOH_E$	5.803	0.03 ± 0.011
ByD_C	5.717	2.91 ± 0.263
ByD_E	5.817	0.76 ± 0.012

En el **Tabla 5.2** se observa que el tiempo de retención fue similar entre muestras con biomasa no estresada (C) como por muestras con biomasa estresada (E). También hay que destacar que, de los extractos obtenidos, la mayor concentración de luteína fue alcanzada por las muestras con biomasa no estresada (C).

De acuerdo con Solovchenko *et al.,* (2008) la cantidad de xantofilas primarias en las microalgas, como la luteína tienden a disminuir en alta intensidad lumínica. Es posible además que dicha disminución pueda deberse a que los cloroplastos se encogen debido al exceso de fotones, y es en éstos dónde la luteína está localizada y es sintetizada (Ladygin, 2000; Solovchenko *et al.,*2008; Ho *et al.,*2013). Un flujo de fotones de entre 30 y 70 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ generan altos contenidos de luteína sin embargo arriba de los 450 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ (en esta investigación se utilizó luz solar que aproximadamente proveía de un flujo de fotones de

1270 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ en promedio) la concentración de este pigmento comienza a disminuir (Ho *et al.,*2013). Por el contrario, exponer las microalgas a bajos flujos de fotones <30 µmoles $m^{-2}s^{-1}$ tampoco induce a la acumulación y síntesis de luteína (Chan *et al.,* 2013). En el **Tabla 5.3** se observa la concentración de luteína obtenida en el presente estudio mediante la extracción sólido-líquido con la biomasa NE, comparada con lo reportado en la literatura.

Tabla 5.3 Concentraciones de luteína reportadas por investigaciones previas.

MDC: Medio de crecimiento, NE: No especificado, flujo de fotones medido en µmoles $m^{-2}s^{-1}$, Periodos horas de Luz: Oscuridad y Tiempo en días

Concentración de luteína (mg/g)	Microalga	Condiciones de crecimiento	Referencia
1.94	*Scenedesmus obliquus* CNW-1	MDC: Detmer modificado Flujo: 150 Periodos: NE Tiempo: 6	Chan *et al.,* 2012
2.13	*S. obliquus* CNW-N	MDC: Detmer Flujo: 60 Periodos: NE Tiempo: 10	
2.8	*Chlorella zofingiensis*	MDC: Amon *et al.,*1974 modificado Flujo: 460 Periodos: 16:8 Tiempo: 22	Del Campo *et al.* 2004
2.91	BR-UANL-01	MDC: EST Flujo: 1270/44 Periodos: 24:0 Tiempo: 26	Esta investigación
2.92	*C. salina*	MDC: Walnes Flujo: 30 Periodos: 16:8 Tiempo: NE	Gayathri *et al.,* 2017

3.5	*C. pyrenoidosa*	MDC: Agua residual: medio f/2 (80:20 *V/V*) Flujo: 95 Periodos: 12:12 Tiempo: 15	Arun *et al.,* 2017
3.63	*S. obliquus* FSP-3	MDC: Detmer Flujo: 150 Periodos: NE Tiempo: 6	Ho *et al.,* 2013

Hay que resaltar que las concentraciones reportadas en la literatura son de cepas puras, y en esta investigación se utilizó un consorcio de microalgas y cianobacterias. Sin embargo, que la mayor concentración de luteína esté presente en la biomasa C es una gran ventaja ya que el consorcio BR-UANL-01 naturalmente acumula luteína intracelular, es decir que no requiere inducción de estrés para que este metabolito sea generado y acumulado, lo que reduce costos de operación si se desea escalar el proyecto contribuyendo a su sustentabilidad y a los conceptos de química verde y economía circular.

Debido a que los pigmentos carotenoides son moléculas que presentan espectros de absorción muy característicos con patrones de picos diferentes entre moléculas se puede realizar una identificación con base en sus espectros de absorción con longitudes de onda específicas (Gayathri *et al.,* 2017). Al realizar el análisis de los extractos obtenidos con el fin de corroborar la identidad de los picos en el cromatograma y con base en lo anteriormente mencionado, se analizaron los espectros de absorción de éstos. Primeramente, se realizó un barrido espectral desde una longitud de onda 200 nm hasta 700 nm del estándar de luteína (Merck), mostrado en la **Figura 5.11**, con el objetivo de conocer el espectro y los picos de absorción del pigmento y compararlo con el espectro mostrado por (**Figura 5.12**). De acuerdo con Alves-Rodrigues y Shao, (2004) la luteína es capaz de absorber la luz en un espectro amplio de longitud de onda entre 440 nm y 590 nm, alcanzando el pico más alto de absorción

entre 444 y 446 nm del espectro visible (Montesano y Gennari, 2011; Gayathri *et al.,* 2017; Arun *et al.,* 2017 y Ortiz y Ferruzzi 2019)

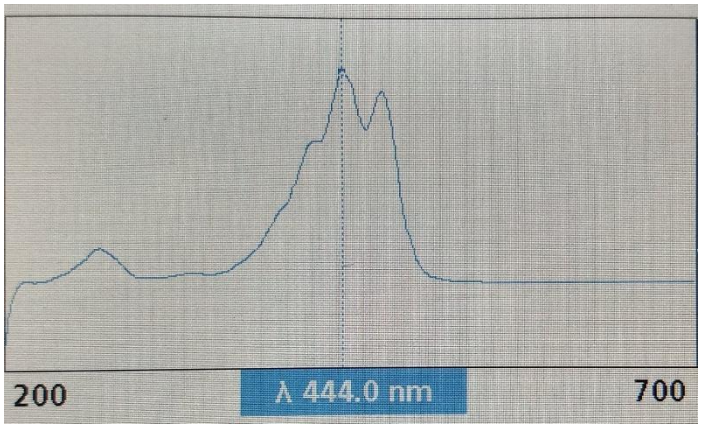


Fig. 5.11. Espectro de absorción resultante del barrido espectral del estándar de luteína que fue desde 200 a 700nm, el estándar absorbe a una longitud de onda entre 400 y 500 nm y el pico más alto es registrado a una longitud de onda de 444 nm.

Para verificar que el pico obtenido en el tiempo de retención indicara la presencia de luteína, se analizaron los espectros de absorción, dando como resultado el patrón característico en dos de ellos, en las muestras con biomasa C tanto de la extracción asistida por ultrasonido como la extracción sólido-líquido, ya que ambos espectros absorben a una longitud de onda entre 400 y 500 nm presentando el pico más alto aproximadamente a 446 nm. Por otra parte, las muestras de biomasa E presentaron un espectro en el que, aunque se infiere la presencia de luteína debido al tiempo de retención, el ruido y la altura del espectro compromete la aseveración, asumiendo que podría ser debido a que la concentración del analito en las muestras es pequeña.

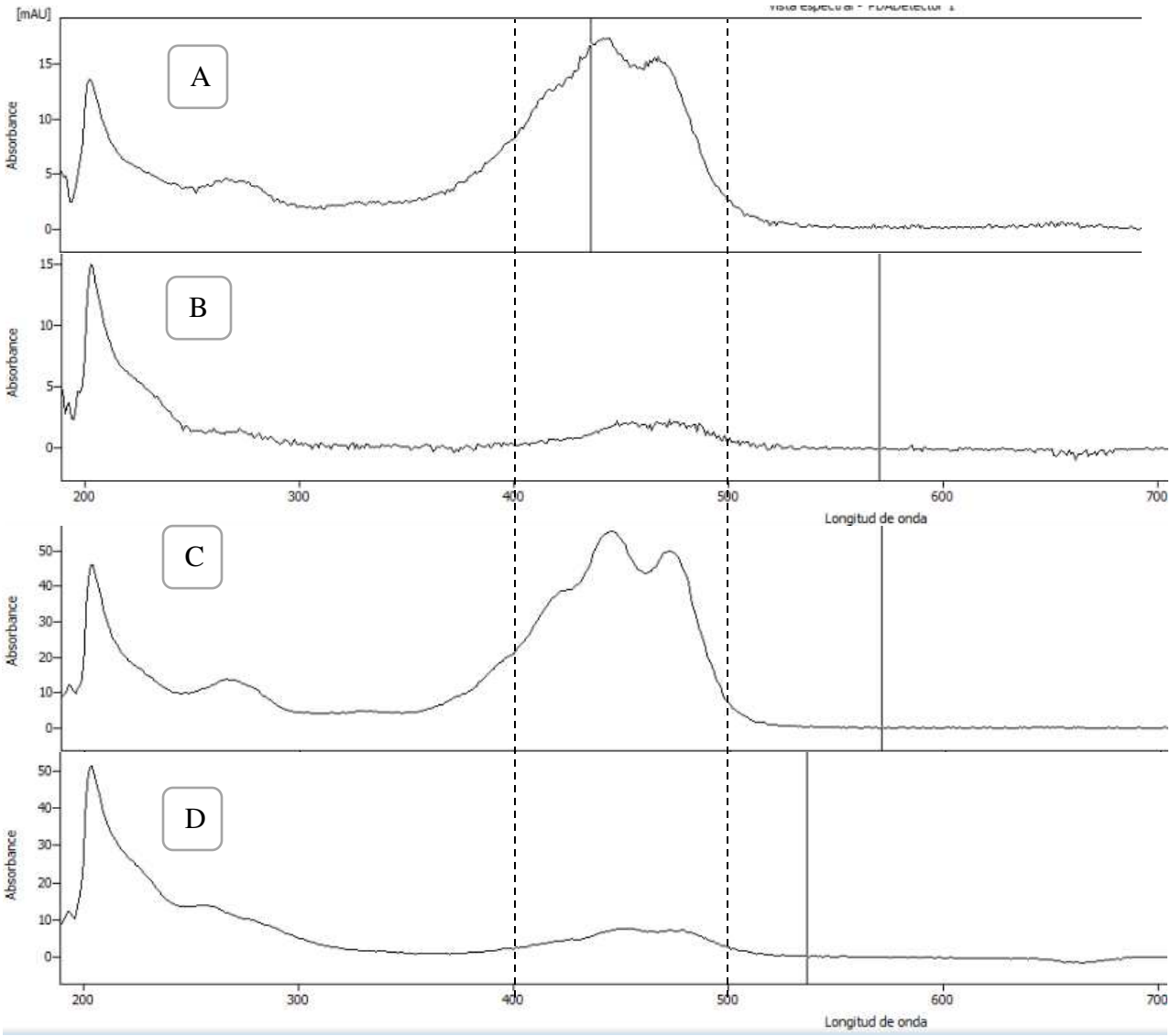


Fig. 5.12 Espectros de absorción de luteína correspondientes a: Extracción asistida con ultrasonido A biomasa no estresada, B biomasa estresada. Extracción sólido líquido C biomasa no estresada y D biomasa estresada

5.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

Es sabido que carotenoides como, luteína y zeaxantina, tienen la habilidad de reprimir los radicales libres, lo cual también apoya el hecho de haber encontrado dichos carotenoides en esta investigación y haber encontrado actividad antiradicalaria. El esqueleto químico de los carotenoides es la cadena de polieno con un sistema de doble enlace conjugado. Esta cadena puede terminar por grupos cíclicos que contienen sustitutos de oxígeno. Es así, como

el sistema conjugado rico en electrones del polieno y los grupos cíclicos funcionales, son quienes determinan la actividad antioxidante de cada carotenoide (Martin *et al.,* 1999).

De modo que los carotenoides tienen la capacidad de eliminar los radicales libres que causan daño oxidativo de tres formas: transferencia de electrones, formación de aductos radicales y la transferencia de los átomos de hidrógeno (Zhang *et al.,* 2013).

- $Carotenoide + R^{\bullet} \rightarrow Carotenoide^{\bullet+} + R^{-}$ (Transferencia de Electrones)
- $Carotenoide + R^{\bullet} \rightarrow [Car\bullet\bullet\bullet R]^{\bullet}$ (Formación de aductos radicales)
- $Carotenoide + R^{\bullet} \rightarrow Car(-H)^{\bullet} + RH$ (Transferencia de hidrógeno)

5.5.1 Actividad antioxidante por el radical ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico) ($ABTS^{\bullet+}$)

Este ensayo de actividad antioxidante es ampliamente usado y se basa en la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical catión $ABTS^{\bullet+}$, el cual es formado previamente por la oxidación del ABTS (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico)), por metamioglobina y peróxido de hidrógeno, hay que destacar que dichos radicales libres pueden ser estabilizados tanto por transferencia de hidrógeno como transferencia de electrones (Londoño-Londoño, 2012).

Para la prueba de actividad antioxidante por el radical (ácido 2,2´-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-Sulfónico)) ($ABTS^{\bullet+}$) se utilizaron extractos de la biomasa no estresada (C) así como de la biomasa estresada (E). Los resultados de esta prueba son mostrados en el **Tabla 5.5** y son expresados como porcentaje de inhibición de µmol de equivalentes de Trolox por gramo de peso seco.

Tabla 5.5. Porcentajes de inhibición del radical ABTS obtenidos por los extractos del consorcio BR-UANL-01.

Muestra	*% de inhibición ($\mu molET\ g^{-1}PS$)*
MeOH $_C$	-1.12 ± 0.76
MeOH $_E$	4.03 ± 0.36
ByD $_C$	51.71 ± 4.23
ByD $_E$	5.6 ± 0. 63

Extracción asistida por ultrasonido MeOH. Extracción sólido líquido ByD. Subíndice C biomasa no estresada (control), subíndice E biomasa estresada. (PS= 0.025g para cada muestra)

Los resultados de porcentaje de inhibición obtenidos en este trabajo resultaron ser menores a lo reportado por Arun *et al.,* (2017), quienes obtuvieron un porcentaje de inhibición de 64.53% para un extracto de 0.025g de *Chlorella pyroneidosa* inoculada en una mezcla de agua residual municipal y medio f/2 (80:20 *V/V*), sin embargo, la extracción ByD_C, aunque fue más baja, resultó similar a lo reportado por ellos. Por otro lado, Safafar *et al.,* (2015) reportaron un porcentaje de inhibición de 5.24% en un extracto de *C. sorokiniana* que contenía 0.025g de biomasa inoculada en agua residual industrial, este valor es similar lo obtenido en ByD_E y mayor a lo registrado por $MeOH_E$.

El porcentaje negativo obtenido por $MeOH_C$ pudo deberse a que la extracción asistida por ultrasonido genera un aumento en la temperatura (Gayathti *et al.,* 2017; Arun *et al.,* 2017) lo que podría propiciar la generación de radicales libres adicionales (Vilkhu *et al,* 2008) los que pudieron acelerar o desencadenar reacciones químicas las cuales resultaron en la degradación de los compuestos extraídos ya que dichos compuestos son termosensibles.

5.5.2 Actividad Antioxidante por el método del poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

Este ensayo fue desarrollado originalmente para medir el poder reductor del plasma; sin embargo, posteriormente fue adaptado para medir actividad antioxidante de productos fitoterapeúticos y nutracéuticos. La reacción mide la reducción de 2,4,6-Tripiridiltriazina

férrica (TPTZ) a un producto coloreado, detectando así compuestos con potenciales redox <0.7 V. Éste método sigue mecanismos de transferencia de electrones y por lo tanto no puede detectar compuestos que miden la capacidad de un antioxidante para estabilizar un radical libre mediante la transferencia de hidrógeno, subestimando el potencial antioxidante de dichos compuestos, sin embargo en combinación con otros métodos pueden lograr distinguir el mecanismo dominante del compuesto antioxidante (Londoño-Londoño, 2012). Los resultadas de esta prueba son mostrados en la **Tabla 5.6**.

Tabla 5.6. Resultados de la prueba antioxidante FRAP, obtenidos por los extractos del consorcio BR-UANL-01, expresados en mg de equivalente de ácido gálico por gramo.

Muestra	*mg GAE g^{-1}*
MeOH $_C$	-2.6 ± 1.01
MeOH $_E$	-2.02 ± 0.25
ByD $_C$	-3.33 ± 1.76
ByD $_E$	-1.30 ± 0.25

Extracción asistida por ultrasonido MeOH. Extracción sólido líquido ByD. Subíndice C biomasa no estresada (control), subíndice E biomasa estresada. (PS= 0.025g para cada muestra)

Los valores obtenidos en este ensayo son menores a lo obtenido por Safafar *et al.,* (2015), quienes obtuvieron 0.18 mg GAE g^{-1}, para un extracto de *C. sorokiniana* el cual contenía 0.025g de biomasa inoculada en agua residual industrial. De igual forma los resultados obtenidos en esta investigación son menores a los reportados por Patil y Kaliwal, (2019), quienes obtuvieron 0.06 mg GAE g^{-1} para un extracto de *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07, que contenía 200 µg de biomasa.

El obtener resultados bajos o negativos en este ensayo no indica un resultado erróneo ya que FRAP es una prueba que trata igual tanto a los reductores como a los oxidantes, debido a que existen compuestos que además de reducir el ion férrico a ferroso, tiene la capacidad de reaccionar con este último para generar nuevos radicales libres como el ácido ascórbico. Además, existen antioxidantes que no son capaces de llevar a cabo la reacción de reducción generando resultados bajos o negativos en dicha prueba (Prior y Cao, 1999).

CAPÍTULO VI
CONCLUSIONES

I. El consorcio reactivado BR-UANL-01 en EST conservó su propiedad autofloculante además de generar ≈ 3 g (BS)/L en un periodo de reactivación de 20 días. Esta característica autofloculante se observó independientemente del tratamiento de inducción de estrés aplicado.

II. Los géneros de microalgas y cianobacterias predominantes en el consorcio BR-UANL-01 fueron: *Scenedesmus sp, Chlorella sp, Microcystis sp* y *Leptolynbya sp.*

III. El tratamiento del lote 1 fue seleccionado para las extracciones y pruebas de actividad antioxidante debido a la alta remoción de fosfatos (88.15%) y su bajo impacto a los parámetros de calidad de la NOM-001-SEMARNAT-1996.

IV. Se logró detectar la producción de luteína por el consorcio BR-UANL-01, comprobando así la hipótesis planteada, a valores equivalentes de acuerdo con la literatura, con la ventaja de haber utilizado un EST y no un medio sintético.

V. Las concentraciones más altas de luteína fueron observadas en los extractos de biomasa bajo condiciones normales de crecimiento, lo que significaría una reducción del costo de escalamiento ya que las condiciones de estrés aplicadas en el presente estudio a las células de microalgas y cianobacterias no mejoraron la obtención de luteína.

VI. La mayor actividad antioxidante por el método ABTS fue obtenida por la extracción sólido-líquido con biomasa en condiciones normales de crecimiento.

VII. La prueba de actividad antioxidante FRAP arrojó resultados negativos para los extractos del consorcio BR-UANL01 lo que podría indicar que dichos extractos tienen la capacidad de reducir radicales libres a través de la transferencia de iones de hidrógeno y no de la transferencia de electrones.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

AlgaeBase (2019). *Leptolyngbya boryana* [Imagen]. Recuperado de http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=Bc79d40fa93882d6f&-session=abv4:93E7F80114252120E1ITs1FB67D4

Alves-Rodrigues, A. y Shao, A. (2004). The Science Behind Lutein. Toxicology Letters, 150: 57-83.

Ambati, R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R., Ravi, S., Bikkina, P., Bo L., y Yuepeng S. (2018): Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, DOI: 10.1080/10408398.2018.1432561

Andrade MR y JAV Costa. 2007. Mixotrophic cultivation of microalga Spirulina platensis using molasses as organic substrate. Aquaculture 264: 130-134.

Arathi, B. P., Sowmya, P. R.-R., Vijay, K., Baskaran, V., y Lakshminarayana, R. (2015). Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects – A review. Trends in Food Science & Technology, 45(1), 105–117. doi:10.1016/j.tifs.2015.06.003

Bellezza, S., Paradossi, G., De Philippis, R., y Albertano, P. (2003). *Leptolyngbya strains from Roman hypogea: cytochemical and physico-chemical characterisation of exopolysaccharides. Journal of Applied Phycology, 15(2/3), 193–200.* doi:10.1023/a:1023811311686

Beltrán-Rocha, J. C. (2017). *Estudio del acondicionamiento y semi-purificación de microalgas nativas para la inducción de floculación, producción de biomasa y pulimento de efluentes municipales*. Tesis doctoral, UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

Beltrán-Rocha, J. C., Guajardo-Barbosa, C., Barceló-Quintal, I. D., y López-Chuken, U. J. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO2. Revista de biología marina y oceanografía, 52(3), 417-427. https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001

Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.

Borowitzka M. A., (2010) Carotenoid production using microorganisms. In: Cohen Z, Ratledge C (eds) Single cell oils: microbial and algal oils. AOCS Press, Urbana, pp 225–240

Borowitzka M. A., Huisman J. M., y Osborn A., (1991) Culture of the astaxanthin-producing green alga Haematococcus pluvialis. 1— Effects of nutrients on growth and cell type. J Appl Phycol 3:295–304

Borowitzka, M. A. (2013). *High-value products from microalgae—their development and commercialisation. Journal of Applied Phycology, 25(3), 743–756.*doi:10.1007/s10811-013-9983-9

Boussiba S, Bing W, Yuan J-P, Zarka A, y Chen F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga Haeamtococcus pluvialis exposed to environmental stresses. Biotechnol Lett;21:601–4.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Science and Technology, 28(1), 25–30. doi:10.1016/s0023-6438(95)80008-5

Brentner, L. B., Eckelman, M. J., y Zimmerman, J. B. (2011). Combinatorial Life Cycle Assessment to Inform Process Design of Industrial Production of Algal Biodiesel. Environmental Science & Technology, 45(16), 7060–7067. doi:10.1021/es2006995

Carter, C. F. (2018). *Scenedesmus dimorphus* [Imagen]. Recuperado de http://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=25944&sk=0

Cembella, A.D., Antia, N.J., Harrison, P.J., 1982. The utilization of inorganic and organic phosphorous compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: part I. Crit. Rev. Microbiol. 10 (4), 317e391.

Cezare-Gomes, E. A., Mejia-da-Silva, L. del C., Pérez-Mora, L. S., Matsudo, M. C., Ferreira-Camargo, L. S., Singh, A. K., & de Carvalho, J. C. M. (2019). *Potential of Microalgae Carotenoids for Industrial Application. Applied Biochemistry and Biotechnology.*doi:10.1007/s12010-018-02945-4

Chan, M.-C., Ho, S.-H., Lee, D.-J., Chen, C.-Y., Huang, C.-C., y Chang, J.-S. (2013). *Characterization, extraction and purification of lutein produced by an indigenous microalga Scenedesmus obliquus CNW-N. Biochemical Engineering Journal, 78, 24–31.*doi:10.1016/j.bej.2012.11.017

Chanakya HN, Mahapatra DM, Sarada R, Abitha R (2013) Algal biofuel production and mitigation potential in India. Miti Adapt Strat Global Change 18:113–13

Chen, J.-H., Chen, C.-Y., Hasunuma, T., Kondo, A., Chang, C.-H., Ng, I.-S., y Chang, J.-S. (2019). *Enhancing lutein production with mixotrophic cultivation of Chlorella sorokiniana MB-1-M12 using different bioprocess operation strategies. Bioresource Technology.*doi:10.1016/j.biortech.2019.01.041

Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D.-J. y Chang, J.-S. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. Bioresource Technology, 229, 53–62. doi:10.1016/j.biortech.2017.01.006

Chioccioli M, Hankamer B, Ross IL (2014) Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. PLoS ONE 9(5): e97269. doi:10.1371/journal.pone.0097269

Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., & Mishra, S. (2017). Salinity induced oxidative stress alters the physiological responses and improves the biofuel potential of green microalgae *Acutodesmus dimorphus.* Bioresource Technology, 244, 1376–1383. doi:10.1016/j.biortech.2017.05.003

Codd, G.A., Lindsay, J., Young, F.M., Morrison, L.F., Metcalf, J.S., (2005). From mass mortalities to management measures, pp. 1–23. In: Huisman, J., Matthijs, H.C.P., Visser, P.M. (Eds.), Harmful Cyanobacteria, Aquatic Ecology Serie. Springer, 241 pp. (Chapter 1).

Colla LM, Reinehr CO, Reichert C, Costa JAV (2007) Production of biomass and nutraceuticals compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen regimes. Biores Technol 98(7):1489–1493

Comisión Nacional del Agua. (2011) Estadísticas del agua en México. Consultado el 1 de mayo de 2018 en: http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SGP-1-11-EAM2011.PDF.

Comisión Nacional del Agua. (2015). Numeragua. México 2015. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua.

Comisión Nacional del Agua. (2016). Estadísticas del agua en México 2016. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua.

Comisión Nacional del Agua. (2017). Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Edición 2017. Ciudad de México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua.

Consejo de las Comunidades Europeas. 1991. Directiva del Consejo 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. DOCE 135/L, de 30-05-91.

Corell, D.L., 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: a review. Journal of Environmental Quality; 27:261–6.

Craigie, J.S. (2011) Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. J. Appl. Phycol., 23, 371–393.

De Bhowmick, G., Sarmah, A. K., y Sen, R. (2019). Performance evaluation of an outdoor algal biorefinery for sustainable production of biomass, lipid and lutein valorizing flue-gas carbon dioxide and wastewater cocktail. Bioresource Technology. doi:10.1016/j.biortech.2019.03.075

Deinove. 2016. Carotenoids market. NATURAL CAROTENOIDS MEETING CONSUMER NEEDS. Recuperado de http://www.deinove.com/en/profile/strategy-and-markets/carotenoids-market

Del Campo JA, Moreno J, Rodrıǵ uez H, Angeles Vargas M, Jn Rivas, Guerrero MG. (2000) Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta). J Biotechnol 2000;76:51–9.

Del Campo, J.A., Rodriguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J., Guerrero, M.G. (2004). Accumulation of astaxanthin and lutein in Chlorella zofingiensis (Chlorophyta). Appl. Microbiol. Biotechnol. 64, 848-854

Del Rio-Chanona, E. A., Ahmed, N. rashid, Zhang, D., Lu, Y., y Jing, K. (2017). *Kinetic modeling and process analysis for Desmodesmus sp. lutein photo-production. AIChE Journal, 63(7), 2546–2554.*doi:10.1002/aic.15667

Dodds, W. K., Bouska, W. W., Eitzmann, J. L., Pilger, T. J., Pitts, K. L., Riley, A. J., Schloesser, J. T. y Thornbrugh, D. J. (2009) Eutrophication of U.S. freshwaters: analysis of potential economic damages. Environmental Science & Technology 43(1), 12–19.

EPA. 2000. Nutrient Criteria Technical Guidance Manual, Lakes and Reservoirs. US Environmental Protection Agency (EPA), Office of Water, EPA-822-B00-001.

Faraloni, C. y Torzillo G. (2017). Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress, Carotenoids, Dragan J. Cvetkovic and Goran S. Nikolic, IntechOpen, DOI: 10.5772/67843.

Fariz, E. (2016). *Degradación microbiana de hidrocarburos presentes en aguas residuales empleando bacterias hierro-reductoras.* Tesis de licenciatura. Universidad Veracruzana, Coatzacoalcos, Veracruz, México.

Fernandes, T. V., Suárez-Muñoz, M., Trebuch, L. M., Verbraak, P. J., & Van de Waal, D. B. (2017). Toward an Ecologically Optimized N:P Recovery from Wastewater by Microalgae. Frontiers in Microbiology, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01742

Franchino, M., Comino, E., Bona, F., y Riggio, V. A. (2013). Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. Chemosphere, 92(6), 738–744. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.04.023

Frank HA, Cogdell RJ. (1996) Carotenoids in photosynthesis. PhotochemPhotobiol 1996;63:257–64.

Gao, F., Peng, Y.-Y., Li, C., Cui, W., Yang, Z.-H., & Zeng, G.-M. (2018). *Coupled nutrient removal from secondary effluent and algal biomass production in membrane photobioreactor (MPBR): Effect of HRT and long-term operation. Chemical Engineering Journal, 335, 169–175.*doi:10.1016/j.cej.2017.10.151

Ghisellini, P., Cialani, C., & Ulgiati, S. (2016). *A review on circular economy: the expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. Journal of Cleaner Production, 114, 11–32.*doi:10.1016/j.jclepro.2015.09.007

Global Market Insights. (2017). Lutein Market Size, Trends- Industry Share Report, 2024. Recuperado de https://www.gminsights.com/industry-analysis/lutein-market

Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., y Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. Algal Research, 24, 403–415. doi:10.1016/j.algal.2016.11.008

Gong, M., y Bassi, A. (2016). *Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. Biotechnology Advances, 34(8), 1396–1412.*

Gordon, J.M., Polle, J.E.W., (2007). Ultrahigh bioproductivity from algae. Applied Microbiology and Biotechnology; 76:969–975.

Gorham, P. R. (1964). Toxic algae. In Jackson, D. F. (Ed.). Algae and Man. Plenum Press, New York, pp. 307–36.

Gouveia, L. (1996). Evolution of pigment composition in Chlorella vulgaris. Bioresource Technology, 57(2), 157–159. doi:10.1016/0960-8524(96)00058-2

Guerrero, M. G., Rodríguez, H., Vargas, M., García-González, M., Campo, J. A. D., Moreno, J., y Rivas, J. (1999). Las microalgas como productoras de pigmentos con interés comercial.

Guiry, M.D. Guiry, G.M. (2018). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado de: http://www.algaebase.org

Hagen C, Grünewald K, Schmidt S, Müller J (2000) Accumulation of secondary carotenoids in flagellates of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyta) is accompanied by an increase in per unit chlorophyll productivity of photosynthesis. Eur J Phycol 35:75–82

Hardy, D., Cubillo, F., Han, M., y Li, H. (2015). Alternative water resources: A review of concepts, solutions and experiences. *The international water association IWA, Alternative water resources cluster Google Scholar*.

Heubeck, S., Craggs, R.J., Shilton, A. 2007. Influence of CO2 scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. Water Science and Technology, 55(11), 193-200.

Ho, S-H., Chan, M-C., Liu, C-C., Chen, C-Y., Lee, W-L., Lee, D-J., Chang, J-S., (2013). Enhancing Lutein Productivity of an Indigenous Microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 Using Light-Related Strategies, Bioresource Technology, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.031

Hoh, D. Watson S.y Kan, E. (2016). Algal biofilm reactors for integrated wastewater treatment and biofuel production: a review, Chem. Eng. J. 287 466–473.

Hu, I.-C. (2019). Production of potential coproducts from microalgae. Biofuels from Algae, 345–358. doi:10.1016/b978-0-444-64192-2.00014-7

Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J.-S., y Lee, D.-J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. Biotechnology Advances, 36(1), 54–67. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.09.009

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2018). "Estadísticas a propósito del día mundial del agua (22 de marzo)", Comunicado de prensa Núm. 132/18, 20 de marzo de 2018.

Kanthale, P.M. Gogate, P.R Pandit, A.B. Wilhelm, A.M. (2003) Mapping of an ultrasonic horn: link primary and secondary effects of ultrasound, Ultrason. Sonochem. 10 331–335.

Khan, F.A., Ansari, A.A., 2005. Eutrophication: An ecological vision. The Botanical Review; 71(4):449-482

Kim S.H., Liu K. H., y Lee S. Y., (2013). Effects of light intensity and nitrogen starvation on glycerolipid, glycerophospholipid, and carotenoid composition in Dunaliella tertiolecta culture. PLoS One. ;8(9):e72415.

Kim, D-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J-I., Lee, K., Park, J-Y., Chang, W-S., Lee, J-S., y Oh, Y-K. (2015), Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*, Bioresource Technology, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107

Kobayashi, M. (2003). Astaxanthin biosynthesis enhanced by reactive oxygen species in the green algaHaematococcus pluvialis. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 8(6), 322–330. doi:10.1007/bf02949275

Koreivienė, J., Valčiukas, R., Karosienė, J., y Baltrėnas, P. (2014). *TESTING OF CHLORELLA/SCENEDESMUS MICROALGAE CONSORTIA FOR REMEDIATION OF WASTEWATER, CO_2 MITIGATION AND ALGAE BIOMASS FEASIBILITY FOR LIPID PRODUCTION. JOURNAL OF ENVIRONMENTAL ENGINEERING AND LANDSCAPE MANAGEMENT, 22(2), 105–114.*doi:10.3846/16486897.2013.911182

Kothari, R., Pandey, A., Ahmad, S. Kumar, A., Pathaki, V. y Tyagi, V. (2017) 7: 243. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0812-8

Krinsky, N.I., Landrum, J.I., Bone, R.A., 2003. Biological mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. Ann. Rev. Nutr. 23, 171–201.

Kurmen, J. E. C., González, G., y Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo diferentes condiciones de estrés. *Nova*, *11*(19), 93-104

Ladygin, V.G. 2000. Biosynthesis of carotenoids in the chloroplasts of algae and higher plants. Rus. J. Plant Physiol. 47, 796-814.

Larkum, A. W., I. L. Ross, O. Kruse, and B. Hankamer. 2012. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. Trends in Biotechnology 30:198–205. doi:10.1016/j.tibtech.2011.11.003.

Lemoine Y, Schoefs B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. PsynR 2010;106:155–77.

Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of Chlorella vulgaris under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. Biotechnol. Lett. 31, 1043–1049.

Lin, J.-H., Lee, D.-J., Chang, J.-S., (2015). Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae. Bioresour. Technol. 184 (Suppl. C), 421–428

Lohrey C, Kochergin V (2012) Biodiesel production from microalgae: co-location with sugar mills. Bioresour Technol 108:76–82

Londoño-Londoño, J. (2012). Antioxidants: biological relevance and methods to measure their activity. Recuperado de: http://hdl.handle.net/10567/133

Macias-Sanchez, M., Mantell, C., Rodriguez, M., Martinez de la Ossa, E., Lubian, L., y Montero, O. (2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from Dunaliella salina. Talanta, 77(3), 948–952. doi:10.1016/j.talanta.2008.07.032

Mahapatra D.M., Varma V.S., Muthusamy S., Rajendran K. (2018) Wastewater Algae to Value-Added Products. In: Singhania R., Agarwal R., Kumar R., Sukumaran R. (eds) Waste to Wealth. Energy, Environment, and Sustainability. Springer, Singapore

Mahapatra DM (2015) Algal bioprocess development for sustainable wastewater treatment and biofuel production. Ph. D. Thesis. Indian Institute of Science, Bangalore, India

Markou G y Nerantzis E, (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions, Biotechnol Adv (2013), http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.011

Martin, H. D. J¨ager, C Ruck, C. Schmidt, M. Walsh R y Paust, J. (1999) Anti - and Prooxidant Properties of Carotenoids, J. Prakt. Chem., 341, 302–308.

Martínez, M. (2000). *Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus. Bioresource Technology, 73(3), 263–272.*doi:10.1016/s0960-8524(99)00121-2

Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., y Adholeya, A. (2016). *A Review on the Assessment of Stress Conditions for Simultaneous Production of Microalgal Lipids and Carotenoids. Frontiers in Microbiology, 7.*doi:10.3389/fmicb.2016.00546

Molina Grima, E., Belarbi, E.-H., Acién Fernández, F., Robles Medina, A., y Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances, 20(7-8), 491–515. doi:10.1016/s0734-9750(02)00050-2

Montaigne, F., Essick, P., (2002). Water Pressure. *Natl. Geog.* 202:2–33.

Moreno-Franco, D., Quintero, J., López, A. (2010). Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia. En: Revista Contactos, 25-33.

Namzaraev, Z. (2010) *Microcystis spp.* [Imagen]. Recuperado de http://bccm.belspo.be/catalogues/ulc-search-results?FIRSTITEM=1&LIST1=ALL+FIELDS&TEXT1=Microcystis&LIST2=SPECIES_NAME&TEXT2=&LIST3=SPECIES_NAME&TEXT3=&LIST4=ACCESSION_NUMBER&TEXT4=&LIST5=ACCESSION_NUMBER&TEXT5=&CONJ=OR&B3=Run+Query

Nguyen, T. D. P., Tran, T. N. T., Le, T. V. A., Nguyen Phan, T. X., Show, P.-L., y Chia, S. R. (2018). *Auto-flocculation through cultivation of Chlorella vulgaris in seafood wastewater discharge: Influence of culture conditions on microalgae growth and nutrient removal. Journal of Bioscience and Bioengineering.*doi:10.1016/j.jbiosc.2018.09.004

NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales

Ometto F., Quiroga G., Senicka P., Whitton R., Jefferson B. and Villa R. (2014), Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal treatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis, Water Res, 65, 350-361.

Orosa, M., Torres, E., Fidalgo, P., y Abalde, J. (2000). *Journal of Applied Phycology, 12(3/5), 553–556.*doi:10.1023/a:1008173807143

Ortiz D., Ferruzzi M.G. (2019) Identification and Quantification of Carotenoids and Tocochromanols in Sorghum Grain by High-Performance Liquid Chromatography. In: Zhao ZY., Dahlberg J. (eds) Sorghum. Methods in Molecular Biology, vol 1931. Humana Press, New York, NY

Patil, L., y Kaliwal, B. B. (2019). Microalga Scenedesmus bajacalifornicus BBKLP-07, a new source of bioactive compounds with in vitro pharmacological applications. Bioprocess and Biosystems Engineering. doi:10.1007/s00449-019-02099-5

Park J.B.K., Craggs R.J. (2010). Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. Water Science and Technology, 61(3), 633-639.

Pirastru, L., Darwish, M., Chu, F. L., Perreault, F., Sirois, L., Sleno, L., y Popovic, R. (2011). *Carotenoid production and change of photosynthetic functions in Scenedesmus sp. exposed to nitrogen limitation and acetate treatment. Journal of Applied Phycology, 24(1), 117–124.*doi:10.1007/s10811-011-9657-4

Prabhakara, H. (2015). Algae use in Wastewater Treatment. *Wastewater and Sludge Treatment,* recuperado de DOI: 10.13140/RG.2.1.3208.3047
Pulz, O. and Gross, W. (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae Mini-Review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 65, 635–648.

Rashid N, MS Ur Rehman, M Sadiq, T Mahmood y JI Han. 2014. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 40: 760-778.

Rasoul-Amini S, N Montazeri-Najafabady, S Shaker, A Safari, A Kazemi, P Mousavi, MA Mobasher y Y Ghasemi. 2014. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 3(2): 126-131.

Renuka, N., Sood, A., Ratha, S. K., Prasanna, R., y Ahluwalia, A. S. (2013). Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. Journal of Applied Phycology, 25(5), 1529–1537. doi:10.1007/s10811-013-9982-x

Richmond A, Hu Q. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2nd Edition. West Sussex, UK:Wiley-Blackwell, 2013.

Rojas, M. C. M. (2011). Estudios de la contaminación de los recursos hídricos en la cuenca del Río San Pedro, previos a la construcción de una hidroeléctrica (P.H. Las Cruces) en Nayarit, México. Tesis Licenciada en Biología. Universidad de Guadalajara

Sacristán de Alva, M., Luna-Pabello, V. M., Cadena, E., y Ortíz, E. (2013). Green microalga Scenedesmus acutus grown on municipal wastewater to couple nutrient removal with lipid accumulation for biodiesel production. Bioresource Technology, 146, 744–748. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.061

Sánchez, J. F., Feranadez, J. M., Acién, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., and Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain Scenedesmus almeriensis. Proc. Biochem. 43, 398–405. doi: 10.1016/j.procbio.2008.01.004

Sandesh Kamath, B., R. Vidhyavathi, R. Sarada, and G. A. Ravishankar. (2008). Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in Haematococcus pluvialis mutants. Bioresource Technology 99:8667–8673. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.013.

Sawayama, S., Rao, K.K., Hall, D.O., (1998). Nitrate and phosphate ions removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor. Applied Microbiology and Biotechnology; 49, 463–468

Schlesinger, A., Eisenstadt, D., Bar-Gil, A., Carmely, H., Einbinder, S., y Gressel, J. (2012). Inexpensive non-toxic flocculation of microalgae contradicts theories; overcoming a major hurdle to

bulk algal production. Biotechnology Advances, 30(5), 1023–1030. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.01.011
Seale, D.B., Boraas, M.E., Warren, G.J., 1987. Effects of sodium and phosphate on growth of cyanobacteria. Water Res. 21 (6), 625e631.

Simon, A. (2018). *La economía circular del agua: dirección obligatoria.* Tecnoaqua, ISSN 2340-2091, Nº. 30, 2018, págs. 108-113

Sindu, E.R.; Preethi, K.C. y Kuttan, R. (2010) Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. Indian J. Exp. Biol., 48, 843–848.

Singh, N. K., y Patel, D. B. (2012). Microalgae for Bioremediation of Distillery Effluent. Farming for Food and Water Security, 83–109. doi:10.1007/978-94-007-4500-1_4

Skjånes K, Rebours C, Lindblad P. (2012). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. Crit Rev Biotechnol 2012:1–44.

Soft-Bodied Stream Algae of California, (2018). Recuperado de http://dbmuseblade.colorado.edu/DiatomTwo/sbsac_site/key.html

Solovchenko, A.E., Khozin-Goldberg, I., Didi-Cohen, S., Cohen, Z., Merzlyak, M.N. 2008. Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga Parietochloris incisa. Rus. J. Plant Physiol. 55, 455-462.

Song, L., Sano, T., Li, R., Watanabe, M. M., Liu, Y., y Kaya, K. (1998). *Microcystin production of Microcystis viridis (cyanobacteria) under different culture conditions. Phycological Research, 42(4), 19–23.* doi:10.1046/j.1440-1835.1998.00120.x

Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., & Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans-β-carotene from citrus peels. Ultrasonics Sonochemistry, 18(1), 243–249. doi:10.1016/j.ultsonch.2010.05.014

Spilling, K., Seppälä, J., y Tamminen, T. (2010). *Inducing autoflocculation in the diatom Phaeodactylum tricornutum through CO2 regulation. Journal of Applied Phycology, 23(6), 959–966.*doi:10.1007/s10811-010-9616-5

Takaichi S. (2011). Carotenoids in algae: distributions, biosyntheses and functions. Mar Drugs 2011;9: 1101–18.

Trabelsi, L., Mnari, A., Abdel-Daim, M. M., Abid-Essafi, S., y Aleya, L. (2016). *Therapeutic properties in Tunisian hot springs: first evidence of phenolic compounds in the cyanobacterium Leptolyngbya sp. biomass, capsular polysaccharides and releasing polysaccharides. BMC Complementary and Alternative Medicine, 16(1).*doi:10.1186/s12906-016-1492-3

Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F., y Rincón, B. (2008). Assessment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. *Environ Technol*. 29(9):985-992

Tsolcha, O. N., Tekerlekopoulou, A. G., Akratos, C. S., Aggelis, G., Genitsaris, S., Moustaka-Gouni, M., y Vayenas, D. V. (2017). *Biotreatment of raisin and winery wastewaters and simultaneous*

*biodiesel production using a Leptolyngbya -based microbial consortium. Journal of Cleaner Production, 148, 185–193.*doi:10.1016/j.jclepro.2017.02.026

Van der Westhuizen, A. J., y Eloff, J. N. (1983). *Effect of Culture Age and pH of Culture Medium on the Growth and Toxicity of the Blue-green Alga Microcystis aeruginosa. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie, 110(2), 157–163.*doi:10.1016/s0044-328x(83)80162-7

Van der Westhuizen, A. J., y Eloff, J. N. (1985). *Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga Microcystis aeruginosa (UV-006). Planta, 163(1), 55–59.*doi:10.1007/bf00395897

Vanthoor-Koopmans, M., Wijffels, R.H., Barbosa, M.J., Eppink, M.H.M., (2013). Biorefinery of microalgae for food and fuel. *Bioresour. Technol.* 135, 142-149.

Vidhyavathi, R., Venkatachalam, L., Sarada, R., y Ravishankar, G.A. (2008). Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. J.Exp.Bot.59,1409–1418.doi:10.1093/jxb/ern048

Vijayakumar, S., y Menakha, M. (2015). *Pharmaceutical applications of cyanobacteria—A review. Journal of Acute Medicine, 5(1), 15–23.* doi:10.1016/j.jacme.2015.02.004

Vilkhu, K. Mawson, R. Simons, L. Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – a review, Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 9 161–169.

Wan, C., Chen, B.-L., Zhao, X.-Q., y Bai, F.-W. (2019). Stress Response of Microalgae and Its Manipulation for Development of Robust Strains. Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment, 95–113. doi:10.1007/978-981-13-2264-8_5

Wang, J.H., Zhang, T.Y., Dao, G.H., Xu, X.Q., Wang, X.X., y Hu, H.Y. (2017). Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies, Appl. Microbiol. Biotechnol. 101 (2017) 2659–2675.

Watanabe, F y Oishi. S. (1985). Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions Appl. Environ. Microbiol. May 1985, 49 (5) 1342-1344.

Wee C. S. y Wee K. Y. (2011). Antioxidant properties of two species of Hylocereus fruits. Advances in Applied Science Reserch. 2: 418-425.

Wher, J. D., Sheath, R. G., y Kociolek, J. P. (2015). Freshwater Algae of North America. USA, ELSEVIER, ISBN: 978-0-12-385876-4

Xie Y-P, Ho S-H, Chen C-Y, Chen C-NN, Liu C-C, Ng I-S, Jing KJ. (2014) Simultaneous enhancement of CO2 fixation and lutein production with thermo-tolerant Desmodesmus sp. F51 using a repeated fedbatch cultivation strategy. Biochem Eng J. 2014;86:33–40.

Xin, L., Hu, H. Y., Ke, G., and Sun, Y. X. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga Scenedesmus sp. Bioresour. Technol. 101, 5494–5500. doi: 10.1016/j.biortech.2010.02.016

Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S., 2013. Microalgae-based biorefinery–from biofuels to natural products. *Bioresour. Technol.* **135**, 166-174.

Zhang, J., Sun, Z., Sun, P., Chen, T., & Chen, F. (2014). Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. Food & Function, 5(3), 413. doi:10.1039/c3fo60607d

Zhang X, Rong J, Chen H, He C, Wang Q (2014) Current status and outlook in the application of microalgae in biodiesel production and environmental protection. Front Energy Res 2:1–15

Zhou W, Min M, Li Y, Hu B, Ma X, Cheng Y, (2012). A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. Bioresource Technology 2012; 110:448–55

Zlotnik I, Sukenik A, Dubinsky Z (1993) Physiological and photosynthetic changes during the formation of red aplanospores in the chlorophyte Haematococcus pluvialis. J Phycol 29:463–469

ANEXO I

Análisis de varianza de monitoreo de pH en fotobiorreactores con inducción de estrés

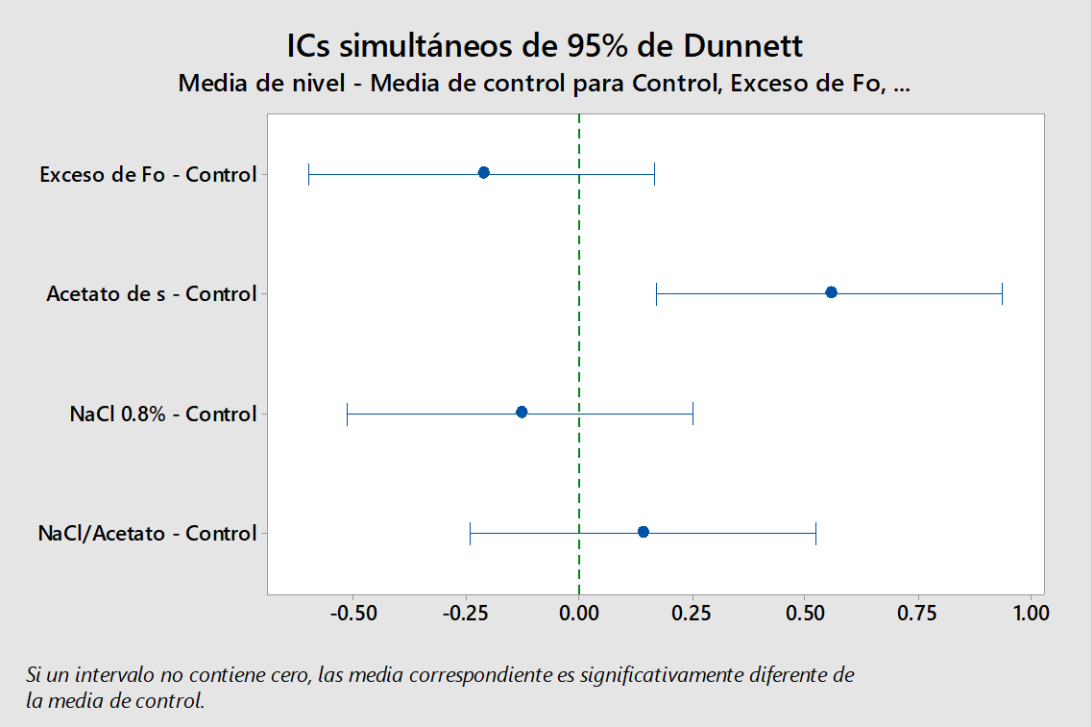
Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	3.304	0.8259	8.10	0.0000700
Error	40	4.079	0.1020		
Total	44				

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

Factor	N	Media	Agrupación
Control (control)	9	8.578	A
Acetato de sodio 2%	9	9.132	
NaCl/Acetato de sodio 0.18/0.49	9	8.7172	A
NaCl 0.8%	9	8.445	A
Exceso de Fotones 24h	9	8.3622	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.



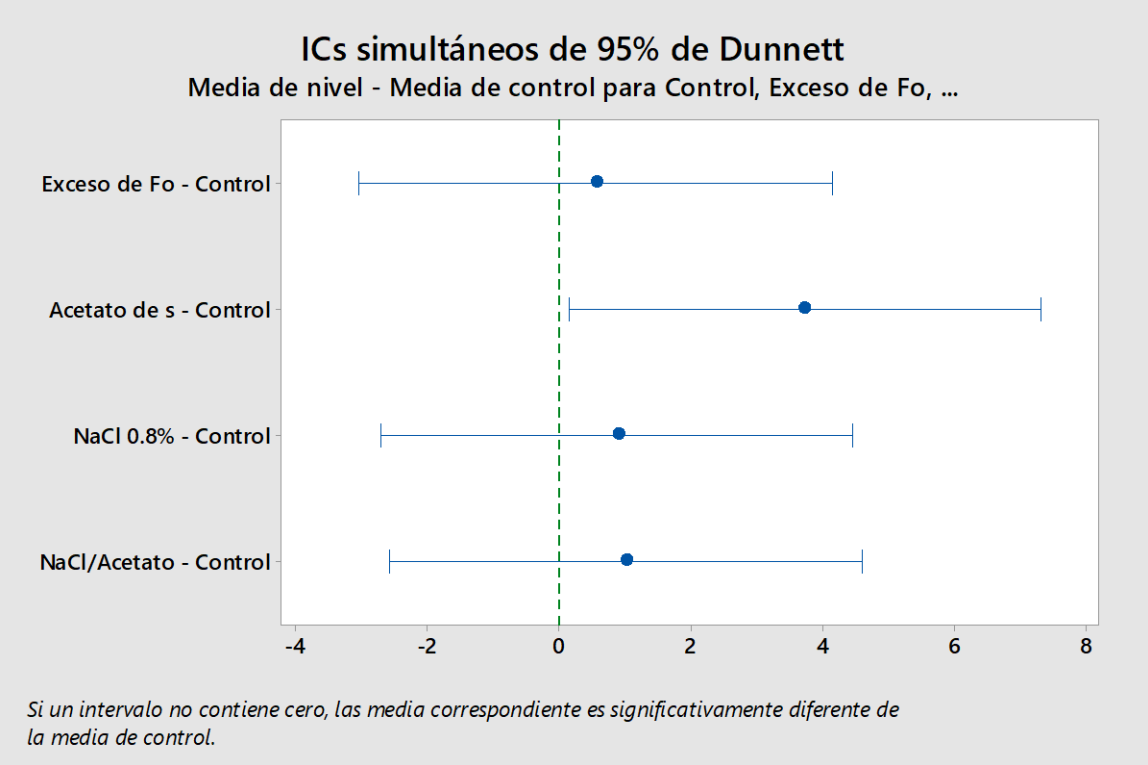
ANEXO II

Análisis de varianza de monitoreo de PO_4^{3-} en fotobiorreactores con inducción de estrés

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	4	66.92	16.729	2.12	0.099
Error	35	275.89	7.883		
Total	39	342.81			

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

Factor	N	Media	Agrupación
Control (control)	8	3.235	A
Acetato de sodio 2%	8	6.96	
NaCl/Acetato de sodio 0.18/0.49	8	4.254	A
NaCl 0.8%	8	4.11	A
Exceso de Fotones 24h	8	3.800	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.