

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE
LÍPIDOS Y CAROTENOIDES TOTALES EN UN EXTRACTO HEXÁNICO DE
Haematococcus pluvialis EN DISTINTOS PERIODOS DE ESTRÉS**

POR

CLAUDIO GUAJARDO BARBOSA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGIA**

DICIEMBRE, 2019

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE
LÍPIDOS Y CAROTENOIDES TOTALES EN UN EXTRACTO HEXÁNICO DE
Haematococcus pluvialis EN DISTINTOS PERIODOS DE ESTRÉS**

Comité de Tesis:

Dr. Luis Jesús Galán Wong
Director

Dr. Hamlet Avilés Arnaut
Secretario

Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal

Dra. Myriam Elías Santos
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDO DE
LÍPIDOS Y CAROTENOIDES TOTALES EN UN EXTRACTO HEXÁNICO de
Haematococcus pluvialis EN DISTINTOS PERIODOS DE ESTRÉS**

Comité de Tesis

Dr. Luis Jesús Galán Wong
Director

Dra. Isela Quintero Zapata
Asesora

Dr. Julio César Beltrán Rocha
Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Facultad de Ciencias Biológicas y a la Subdirección de Estudios de Posgrado (FCB), pertenecientes a la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Así como a la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

A mi director de tesis el Dr. Luis Jesús Galán Wong, por abrirme las puertas del Instituto de Biotecnología y darme grande enseñanza de practicidad de ideas y mostrarme que la ciencia sirve para aplicarse, lo cual siempre tendré presenta en mi memoria.

A la Dra. Myriam Elías Santos, por todo su gran apoyo al permitirme realizar la mayor parte de este proyecto en el laboratorio 6 del Instituto de Biotecnología de la FCB; pero sobre todo por ofrecerme su valiosa amistad.

A mi asesor externo el Dr. Julio César Beltrán Rocha por su invaluable colaboración, por ser un pilar indispensable en el desarrollo de esta investigación y por su amistad incondicional.

Al Dr. Hugo A. Luna Olvera por su gran apoyo en la enseñanza que me brindó en la redacción de artículos científicos.

A la Dra. Isela Quintero Zapata por Abrirme las puertas del laboratorio L-6 del I.B. y por el gran apoyo que me brindó a lo largo de mi estancia en dicho laboratorio.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por brindarme gran enseñanza y consejos al estar semestre tras semestre revisando y evaluando la presentación de mis cárteles.

Al Dr. José María Viader Salvadó y a la Dra. Martha Guerrero Olazarán por su infinita paciencia y por el tiempo que invirtieron en mí al abrirme el entendimiento sobre método científico.

A la Dra. Alma Elisa Mora Zúñiga, compañera y gran amiga, por su especial colaboración al asesorarme en el desarrollo metodológico.

DEDICATORIA

A Dios por su infinita misericordia y por no dejarme caer de su mano.

A mi gran amigo el M.C. Martin Camarena⁺. Gran científico. Siempre me ayudaste en las malas y en las peores. Por todos los consejos y ánimo que me diste cuando más lo necesitaba. Que Dios te tenga en el paraíso haciendo experimentos.

A mis hijos Tomás Guillermo, Daniel y Ana por tenerlos siempre a mi lado con su apoyo, amor y confianza.

A mi madre Olga Clara Barbosa por darme con cariño mi formación e ideales de una buena conciencia.

A mi padre David Homero Guajardo Gutiérrez por ser siempre de gran ayuda en mi trabajo con mucho ingenio y por su apoyo incondicional.

A mis hermanos David, Julio César y Ernesto Alonso por estar de una u otra forma siempre presente apoyándome.

Y a todos los que de alguna u otra forma me acompañaron en esta etapa.

Índice

INDICE DE TABLAS	IX
INDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Metabolitos de las microalgas	3
Mecanismos de asimilación de nutrientes por las microalgas	3
Comercialización de las microalgas	4
Importancia económica de las microalgas	7
Carotenoides y biología de <i>H. pluvialis</i>	8
Producción de <i>H. pluvialis</i> y obtención de pigmentos	12
Escalamiento biotecnológico de <i>H. pluvialis</i>	12
Extracción de los carotenoides y lípidos de <i>H. pluvialis</i>	13
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos particulares	
MATERIAL Y MÉTODOS	16
1.- Cultivo de <i>H. pluvialis</i>	16
2.- Determinación del crecimiento celular	16
3.- Evaluación de depleción de nitrato	16
4.- Inducción al estrés en <i>H. pluvialis</i>	17
5.- Estimación de la viabilidad celular	18
6.- Análisis de lípidos	19
7.- Análisis de carotenoides totales	19
8.- Determinación de la capacidad antioxidante	20
9.- Análisis estadístico	20
	23

RESULTADOS	
1.- Cultivo de <i>H. pluvialis</i> y cinética de crecimiento	21
Densidad celular	
Cinética de crecimiento expresada en peso seco	
4.- Depleción de Nitrato	23
4.1 Curva de calibración de nitrato	23
4.2 Cinética de depleción de nitrato	23
5.- Inducción al estrés celular	24
6.- Estabilidad de la biomasa durante el estrés	26
8.- Viabilidad celular	27
7.- Obtención del extracto en los diferentes periodos de estrés	
8.- Análisis de lípidos durante el estrés celular de <i>H. pluvialis</i>	29
9.- Análisis de carotenoides totales en <i>H. pluvialis</i>	30
10.- Capacidad antioxidante	31
10.1 Inhibición del radical DPPH	31
10.2 Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox	
DISCUSIONES	33
CONCLUSIONES	34
PERSPECTIVAS	35
BIBLIOGRAFÍA	36
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	58

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag.
1.	Mecanismo de asimilación de C, N y P por microalgas.	4
2.	Metabolitos sintetizados a partir de microalgas y aplicaciones.	6
3.	Ciclo de reproducción de <i>H. pluvialis</i> .	9
4.	Cambios morfológicos en <i>H. pluvialis</i> y principales metabolitos producidos en condiciones de estrés.	10
5.	Vía biosintética de la carotenogenesis en <i>H. pluvialis</i>	11
6.	Fase estacionaria (17 días de cultivo) del cultivo de <i>H. Pluvialis</i>	21
7.	Cinética de crecimiento de <i>H. pluvialis</i>	22
8.	Concentración peso seco de <i>H. pluvialis</i> durante el cultivo	22
9.	Concentración de nitrato a través del tiempo de cultivo de <i>H. pluvialis</i>	23
10.	Cambio en la coloración de los cultivos de <i>H. pluvialis</i> a 12 días de estrés por los distintos tratamientos	24
11.	<i>H. pluvialis</i> a los 12 días de estrés, en los diferentes tratamientos, Imagen (40x)	25
12.	Peso seco de <i>H. pluvialis</i> en los diferentes tratamientos, durante el tiempo de estrés	26
13.	Imagen, célula viable (naranja) junto a célula no viable (azul) 40x	27
14.	Gráfico de permeabilidad celular con respecto al tiempo de estrés	28
15.	Extracto hexánico de los carotenoides en fase prequística y extracción en fase quística	29
16.	Concentración de lípidos en los diferentes periodos de estrés	30
17.	Acumulación de carotenoides en los diferentes periodos de estrés.	31
18.	% Inhibición del DPPH en los diferentes periodos de estrés	32
19.	TEAC en los diferentes periodos de estrés	33

LISTA DE ABREVIATURAS

M: Moles

μM : Fotón/m²s: Micromoles de fotones por metro cuadrado en un segundo

BBM: Medio basal Bold

DPPH: 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo

N-NO₃⁻ : Nitrógeno de nitrato

Rpm: Revoluciones por minuto

TEAC: Capacidad antioxidante en equivalentes de trolox

RESUMEN

El alga verde *Haematococcus pluvialis* se encuentra comúnmente en climas templados de todo el mundo y es una de las fuentes biológicas más importantes de carotenoides; Los cuales se acumulan en forma de vesículas alrededor del núcleo y se forman sometiendo a condiciones de estrés como limitación de nutrientes o exposición a la luz ultravioleta. Lo cual origina cambios morfológicos que van de fases flageladas y palmeloides a fases prequísticas y quísticas las cuales varían en función del medio de cultivo. El contenido de astaxantina en *H. pluvialis* en las fases prequísticas y quísticas representa el 90% de los carotenoides totales y tiene una extraordinaria capacidad antioxidante (500 veces mayor que el β -caroteno). Aparte de los carotenoides, *H. pluvialis* es productora de grandes cantidades de lípidos, los cuales hasta el 50% de su peso seco. La extracción de los carotenoides de *H. pluvialis* a nivel industrial se realiza en la fase quística (o de hematocisto). La pared celular en esta fase es extremadamente dura y para poder romperla se utilizan fluidos supercríticos; incrementa aún más el costo de producción de los carotenoides extraídos (principalmente de astaxantina). El bajo rendimiento de carotenoides y el alto gasto energético durante el proceso de extracción de *H. pluvialis* en la fase quística, hacen que el valor de comercialización de los carotenoides obtenidos se incremente a niveles que son inaccesibles para la mayor parte de la población. La fase prequística de *H. pluvialis* ha mostrado una mayor facilidad de rompimiento de pared en comparación a la fase quística. Asimismo, la preparación de extractos hexánicos en fase prequística solubilizó los carotenoides y lípidos de la microalga. Se cultivó *H. pluvialis* en fotobiorreactores de 1 L, con un inóculo de 1×10^4 cel/mL, sin fotoperiodo (iluminación constante 24h) a $40 \mu\text{M}$ fotón/m²s, a una temperatura de 25°C, y flujo de aire de 1 L/min. La producción máxima de biomasa fue en 17 días. Para iniciar la carotenogénesis en la biomasa de *H. pluvialis* se indujo a estrés por depleción de nitrógeno y por adición de Fe²⁺. Se prepararon 3 tratamientos de 0.45, 1.35 y 4.05 mM de Fe²⁺ y un control sin Fe²⁺. El estrés hasta fase prequística ocurrió en 12 días. La biomasa de cada tratamiento fue extraída con hexano y se determinó la concentración de lípidos, carotenoides y actividad antioxidante. La máxima

concentración de lípidos y carotenoides en fase prequística de *H. pluvialis* para las distintas concentraciones de Fe^{2+} (0, 0.45mM, 1.35mM y 4.05mM) se generó tras un periodo de inducción de estrés de 8 días. El máximo valor de lípidos, carotenoides y capacidad antioxidante del extracto hexánico de *H. pluvialis* se obtuvo en un periodo de 8 días de estrés y 1.35 mM de Fe^{2+} .

ABSTRACT

The green algae *Haematococcus pluvialis* is commonly found in temperate climates around the world and is one of the most important biological sources of carotenoids; Which accumulate in the form of vesicles around the nucleus and are formed by subjecting it to stress conditions such as nutrient limitation or exposure to ultraviolet light. Which causes morphological changes ranging from flagellated and palmeloid phases to precystic and cystic phases which vary depending on the culture medium. The content of astaxanthin in *H. pluvialis* in the precystic and cystic phases represents 90% of the total carotenoids and has an extraordinary antioxidant capacity (500 times greater than β -carotene). Apart from carotenoids, *H. pluvialis* is a producer of large amounts of lipids, which up to 50% of their dry weight. The extraction of carotenoids from *H. pluvialis* at the industrial level is performed in the cystic phase. The cell wall in this phase is extremely hard and to break it, supercritical fluids are used; further increases the cost of production of carotenoids extracted (mainly astaxanthin). The low yield of carotenoids and the high energy expenditure during the extraction process of *H. pluvialis* in the cystic phase, increase the marketing value of the carotenoids obtained to levels that are inaccessible to most of the population. The precystic phase of *H. pluvialis* has shown a greater ease of wall breaking compared to the cystic phase. Likewise, the preparation of hexane extracts in the precystic phase solubilized the carotenoids and microalgae lipids. *H. pluvialis* was cultured in 1 L photobioreactors, with an inoculum of 1×10^4 cell / mL, without photoperiod (constant illumination 24h) at $40 \mu\text{M}$ photon / m^2 , at a temperature of 25°C , and air flow of 1 L / min the maximum biomass production was in 17 days. To initiate carotenogenesis in the biomass of *H. pluvialis*, stress was induced by nitrogen depletion and by the addition of Fe^{2+} . Three treatments of 0.45, 1.35 and 4.05 mM of Fe^{2+} and a control without Fe^{2+} were prepared. Stress until precystic phase occurred in 12 days. The biomass of each treatment was extracted with hexane and the concentration of lipids, carotenoids and antioxidant activity was determined. The maximum concentration of lipids and carotenoids in the precystic phase of *H. pluvialis* for the different Fe^{2+} concentrations (0.45mM, 1.35mM and 4.05mM) was generated after an 8-day stress induction period. The maximum value of lipids, carotenoids and

antioxidant capacity of the hexane extract of *H. pluvialis* was obtained in a period of 8 days of stress and 1.35 mM Fe²⁺.

1.- INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos, polifiléticos y eucariotes que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica. En general son altamente eficientes en la fijación de CO₂ y captación de luz solar para producir biomasa. Están presentes en todos los cuerpos de agua como lagos, mares y ríos; sin embargo, no son exclusivos de cuerpos de agua, ya que también se encuentran presentes en el suelo y la mayoría de los ambientes terrestres incluso los más extremos por lo que prácticamente están distribuidas en toda la biosfera, así mismo tienen una gran diversidad taxonómica.

Para su desarrollo requieren de CO₂, nitrógeno, fosforo, potasio, magnesio y otros metales traza que actúan como cofactores enzimáticos en su metabolismo.

En general, la composición de las microalgas es CO_{0.48} H_{1.83}N_{0.11}P_{0.01}, y se ha encontrado que las microalgas tienen varios constituyentes, principalmente lípidos (7–23%), carbohidratos (5–23%), y proteínas (6–52%). Las composiciones químicas de las microalgas dependen principalmente de las especies y las condiciones de cultivo (Zhu y Li 2016).

Asimismo, las microalgas, debido a su desarrollo fotosintético, están expuestas a estrés por oxígeno y radicales libres. Como resultado, las microalgas han desarrollado numerosos sistemas antioxidantes frente a radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que promueven una acumulación de complejos antioxidantes altamente efectivos en la disipación de especies oxidantes.

En las microalgas verdes suelen presentar carotenoides primarios (ej. β-caroteno, luteína, violaxantina) que se distribuyen dentro de los cloroplastos de las algas verdes (membranas tilacoides), junto con las clorofilas. Se puede inducir un proceso de carotenogénesis en respuesta a la depleción de nutrientes u otras condiciones de estrés, es decir, condiciones ambientales (p. Ej., exceso de Luz, salinidad alta y depleción de nutrientes) que resulta en un desequilibrio metabólico que conduce ajustes bioquímicos y metabólicos antes de pasar a una nueva fase estable de crecimiento más estable. (Vonshak y Torzillo 2004). Las microalgas carotenogénicas presentan carotenoides secundarios, como

la cantaxantina y la astaxantina, los cuales se acumulan en glóbulos lipídicos, principalmente fuera de los plástidos cloroplásticos (Goodwin y Britton 1988).

El valor comercial de los antioxidantes varía dependiendo, en esencia, del grado de pureza y de su capacidad antioxidante. El mercado de los carotenoides y xantofilas varía entre 300 y 500 millones de euros/año. Por tanto, actualmente crecen las posibilidades que presentan las algas como fuente de sustancias funcionales y como base para la producción de suplementos alimentarios. Actualmente, en este campo se han comercializado distintos géneros de microalgas como: *Haematococcus* spp., *Chlorella* spp., *Dunaliella* spp., *Scenedesmus* spp., y *Spirulina* spp. como alimentos altamente nutricionales y como materia prima para la extracción de sustancias de interés fisiológico, tales como: lípidos, proteínas, clorofila, carotenoides, vitaminas minerales y pigmentos, a lo que se le une la posibilidad de su producción masiva y manipulación con técnicas biogénicas.

La aplicación de la biotecnología con microalgas para la producción de pigmentos y productos químicos finos demandados por la industria farmacéutica y alimentaria resulta un mercado atractivo debido a que se alcanzan altos valores de venta tales como: 215–2150€/kg β -caroteno, 43€/g ácido docosahexaenoico (DHA), 7 €/mg astaxantina, 11–50€/mg ficobiliproteínas (L. Brennan, & P. Owende. 2010)

En la actualidad la microalga carotenogénica *H. pluvialis* ha sido identificado como el organismo que puede acumular el nivel más alto de astaxantina en la naturaleza (1.5–3.0% de peso seco), siendo actualmente la principal fuente natural de astaxantina natural para la explotación comercial (Cysewski y Todd-Lorenz 2004) y otros metabolitos (echinenona, cantaxantina y adonirrubina) (Hernández y Labeé. 2015). No obstante, las limitantes de la producción de pigmentos de *H. pluvialis* se debe en parte a su baja producción (0.5-5.0 g / L de peso seco) de biomasa y escasa acumulación de carotenoides (>4% del peso seco) (Collins et al. 2011., Vandamme et al. 2013). Estas limitantes han generado el desarrollo de una serie de proyectos de investigación que buscan reducir el período de crecimiento de *H. pluvialis* e inducir una mayor producción de los metabolitos de interés (Panis y Carreón 2016) a través de la evaluación de parámetros como la intensidad de la luz, temperatura, composición del medio de cultivo y limitación de nutrientes (e.g., nitrógeno), entre otros.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Metabolitos de microalgas

Muchas especies de microalgas presentan un alto valor nutricional, además de producir una amplia variedad de metabolitos de alto valor económico, estos pueden ser carotenoides, lípidos, ficobilinas, polisacáridos, biohidrógeno, biopoliésteres con propiedades parecidas al plástico y pigmentos.

Existe una gran cantidad de especies de microalgas disponibles, y el conocimiento de la composición química es obligatorio como primer paso en una metodología de detección, ya que esto es útil para identificar metabolitos valiosos como pigmentos, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), etc. en la microalga estudiada.

Como con cualquier planta superior, la composición química de las algas no es un factor constante intrínseco, sino que varía en un amplio rango. Los factores ambientales, como la temperatura, la salinidad, la iluminación, el valor de pH, el contenido mineral, el suministro de CO₂, la densidad de población, la fase de crecimiento y el estado fisiológico, pueden modificar en gran medida la composición química (Hu 2004). La mayoría de los parámetros ambientales varían según la estación, y los cambios en las condiciones ambientales pueden estimular o inhibir la biosíntesis de varios nutrientes. Por lo tanto, las condiciones de crecimiento podrían optimizarse para maximizar la producción de las biomoléculas de interés. Debido a que las algas deben adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones ambientales para sobrevivir, producen una gran variedad de metabolitos secundarios (biológicamente activos), con estructuras que no se pueden encontrar en otros organismos (Gouveia et al. 2013).

2.2 Mecanismo de asimilación de nutrientes por microalgas

El mecanismo de asimilación de C, N y P con microalgas se presenta en la Figura 1. Las microalgas usan como fuente de carbono tanto el CO₂ proveniente de la atmósfera, como los carbonatos ionizados (HCO₃⁻) presentes en el agua (Wang et al., 2008). En cambio, para la bioasimilación de nitrógeno se realiza la reducción de NO₃⁻ a NH₄⁺ lo que genera un

residuo de NO_2^- el cual se libera al medio acuoso. (Burhenne y Tischner 2000; Wang et al. 2010). Por otra parte, las microalgas disponen del fósforo asimilándolo en forma de HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- para luego integrarlo en sus componentes orgánicos por medio del mecanismo de fosforilación, útil para la generación de adenosin trifosfato (ATP), indispensable para el suministrar energía a la célula (Martínez et al. 2000; Cai et al. 2013).

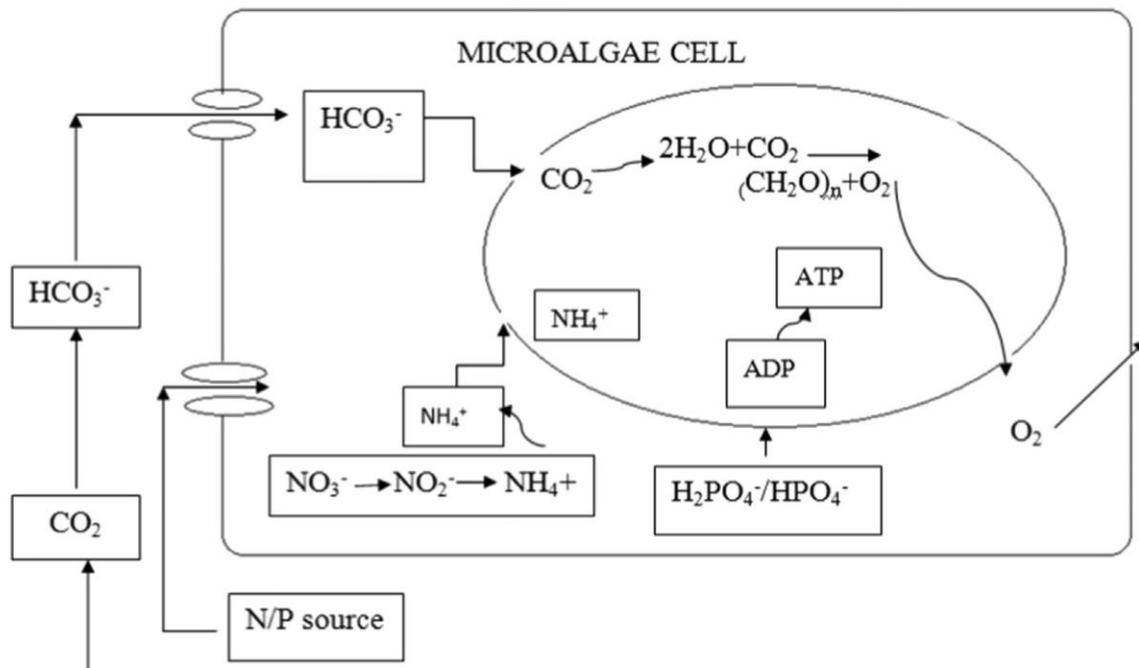


Figura 1. Mecanismo de asimilación de C, N y P por microalgas (Abinandan y Shanthakumar 2015)

2.3 Comercialización de las microalgas

Las microalgas son una fuente potencialmente excelente de compuestos naturales, que podrían usarse como ingredientes funcionales (Gouveia et al. 2013).

La adición de biomasa microalgal a los productos alimenticios es una herramienta interesante para proporcionar suplementos nutricionales con compuestos biológicamente activos. (ej., antioxidantes, PUFA- ω 3), Además de los propósitos de coloración. En consecuencia, la selección de especies de microalgas con perfiles nutricionales equilibrados es fundamental para el desarrollo exitoso de nuevos alimentos. Una caracterización fisicoquímica detallada de las microalgas es una etapa esencial que permitirá determinar qué algas son más adecuadas para diferentes aplicaciones y propósitos (Batista et al. 2013).

Los carotenoides presentan un potencial éxito de comercialización como “alimentos funcionales”, cosméticos, acuicultura y productos farmacéuticos. También son productoras de un alto contenido de lípidos y ácidos grasos poliinsaturados esenciales en nutrición humana. Esto conllevará a su uso en la obtención de alimentos sanos, así como la extracción de compuestos de alto valor económico en la industria farmacéutica. Por último, los subproductos del proceso de extracción de las microalgas (biomasa sobrante) pudiéndose utilizar como forraje o biofertilizante (Pulz y Gross 2004; Mata et al, 2010; Chu 2012; Batista et al. 2013; Koller et al. 2014).

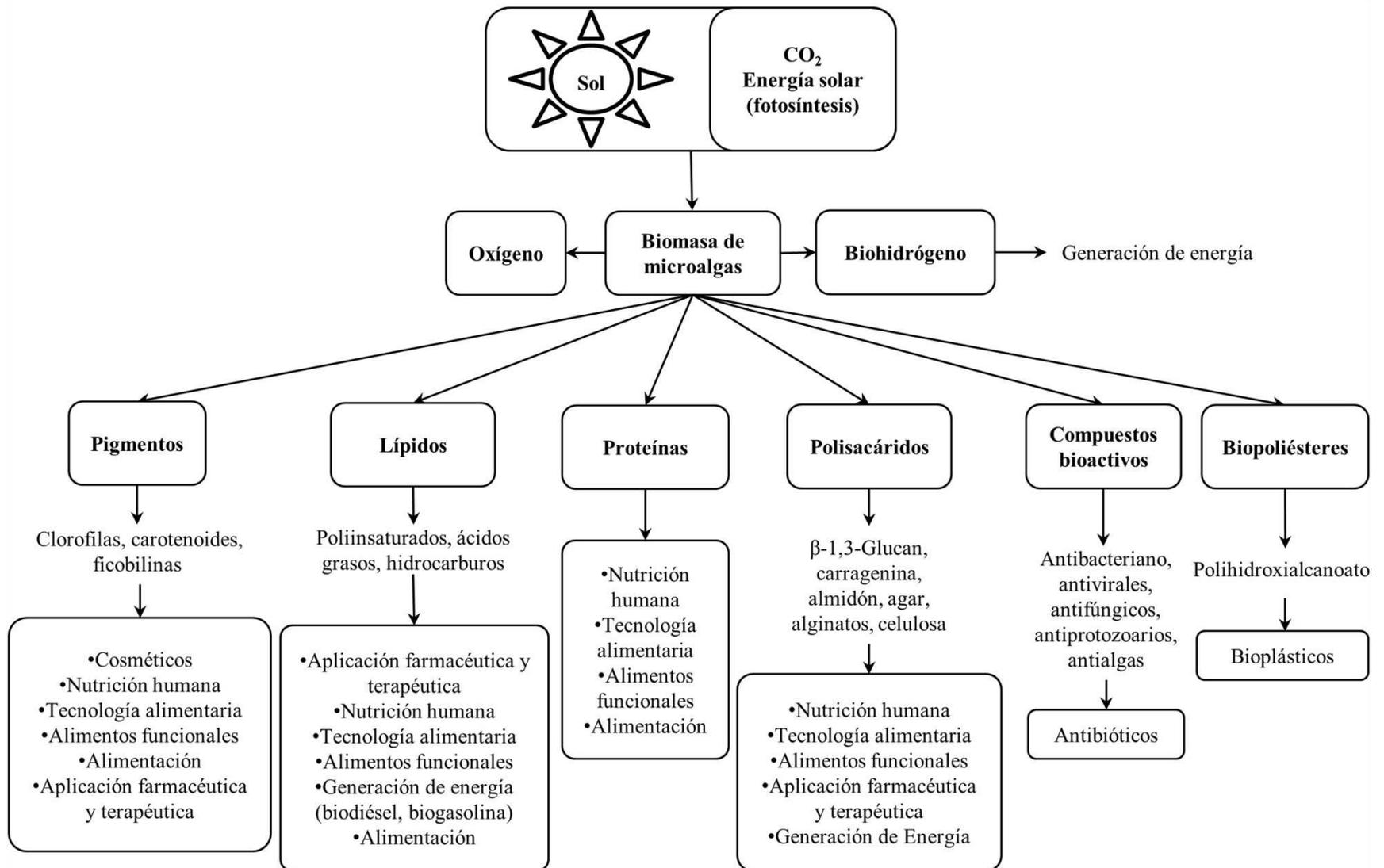


Figura 2.- Metabolitos sintetizados a partir de microalgas y aplicaciones (Koller et al. 2014)

2.4 Importancia económica de las microalgas

El valor comercial de las microalgas y sus componentes depende de la zona geográfica donde se produzcan, la demanda y la pureza del producto. Es de consideración que existen metabolitos que pueden ser extraídos y que se producen en pequeños porcentajes, pero que presentan los valores más altos de comercialización. Esto debido a que su extracción implica cierta dificultad en su aislamiento y purificación, por lo que los costos en el mercado son muy altos (Koller et al. 2014) (Tabla 1).

Tabla 1. - Precios y volumen en el mercado mundial de algunos productos de microalgas (Koller et al. 2014)

Producto	*Precio de mercado aproximado por Kg [USD- $\$$]	Volumen global del mercado [USD- $\$$]
Biomasa nutrientes	para 40 – 50	1.25×10^9
Biomasa alimentación	para 10	4×10^9
Nutracéuticos microalgas para la nutrición humana	de 120	7×10^7
β -caroteno	300 – 3000	2×10^8
Astaxantina	> 2000	2×10^8
Ficobiliproteínas	3000 – 25,000	5×10^7
β -1,3-glucan	5 – 20	1×10^8 (estimación para EE.UU.)
Ácido docosahexaenoico	50	1×10^8 (estimación de la República Popular China); 4×10^8 (estimación para EE.UU.)
Ácido eicosapentaenoico	4600 (cultivo puro de <i>Phaeodactylum tricornutum</i> , producto de alta pureza)	1.25×10^3 (estimación para Japón)
Biodiésel	**0.5 (precio general)	1×10^9

Tipo de cambio periodo 2019- 10: Peso Mexicano – US Dólar (MXN-USD) \$ 19 MXN – 1 USD; ** La estimación de biodiésel a partir de microalgas es fuertemente fluctuante (3 – 4 [USD- $\$$] por Kg)

2.5 Carotenoides y Biología de *H. pluvialis*

H. pluvialis es una microalga de agua dulce, perteneciente al Phylum Chlorophyta, a la clase Chlorophyceae, y al orden de las volvocales. El Phylum Chlorophyta incluye todas las algas con plástidos rodeados por dos membranas, que contienen los pigmentos fotosintéticos clorofila a y b y que forman estados flagelados de esporas o gametos. El principal producto de almacenamiento de carbohidratos es el almidón (α -1,4-glucano) depositado dentro del plástido. Se encuentra comúnmente en climas templados de todo el mundo. Sus quistes son responsables del color rojo sanguinolento que se observa en la parte inferior de las charcas formadas por agua de lluvia. Su ciclo vital presenta polimorfismo celular con formas flageladas, palmeloides, y prequistivas y quísticas las cuales varían en función del medio de cultivo (Fig, 3)

El alga verde *H. pluvialis* es una de las fuentes biológicas más importantes de carotenoides. Otras especies de microalgas capaces de acumular carotenoides secundarios son: *Botryococcus braunii*, *Chlamydomonas nivalis*, *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chloromonas nivalis*, *Coelatrella striolata var. multistriata*, *Dunaliella sp.*, *Eremospherea viridis*, *Euglena sp.*, *Neochloris wimmeri*, *Scenedesmus sp.*, *S. obliquus*, *Scenedesmus komarekii*, *Scotiellopsis oocystiformis*, *Protosiphon botryoides*, *Tetracystis intermedim* y *Trachelomonas volvocina* (Lemoine y Schoefs 2010). A diferencia de las especies antes mencionadas, el contenido de astaxantina en *H. pluvialis* representa el 90% de los carotenoides totales. Por lo tanto, la extracción de este compuesto de otras especies representa una desventaja en comercial debido a los pasos de purificación y los costos de procesamiento. (Borowitzka 2013).

La Reproducción asexual es por división de las células vegetales en zoosporas en número de 4 a 8. Las células vegetativas con frecuencia se convierten en aplanosporas con paredes gruesas que producen zoosporas. Reproducción sexual isógama, la planozigota cuadriflagelada pierde sus flagelos y secreta una pared engrosada al final el ciclo. Meiosis aparentemente zigóticas (Córdoba et al. 2014).

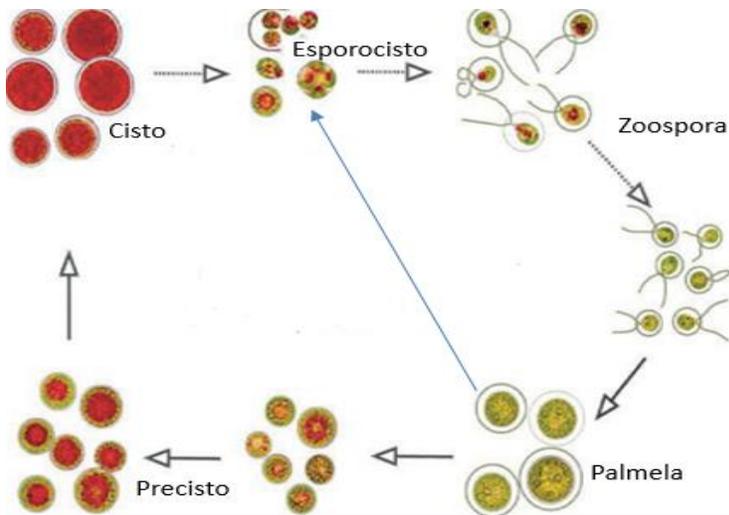


Fig 3.- Ciclo de reproducción de *H. pluvialis* (Córdoba et al. 2014).

H. pluvialis puede crecer en condiciones mixotróficas, pero normalmente es fotoautótrofa. Los cultivos aislados de *H. pluvialis* pueden crecer en condiciones heterótrofas en oscuridad usando nitrógeno orgánico y acetato como fuente de carbono (C. D. Kang, Lee, Park, & Sim, 2005)

Los carotenoides de *H. pluvialis* se acumulan en forma de vesículas alrededor del núcleo y se forman sometiendo a condiciones de estrés como limitación de nutrientes o exposición a la luz ultravioleta. Además, la síntesis de astaxantina por *H. pluvialis* se realiza en situación de cese de la división celular, cese de la fotosíntesis y condiciones extremas como depleción de nutrientes, deshidratación y exposición a luz solar extrema o a agentes químicos. En estas situaciones se produce un cambio morfológico profundo en la célula, induciendo la carotenogénesis (Abalde et al. 1999).

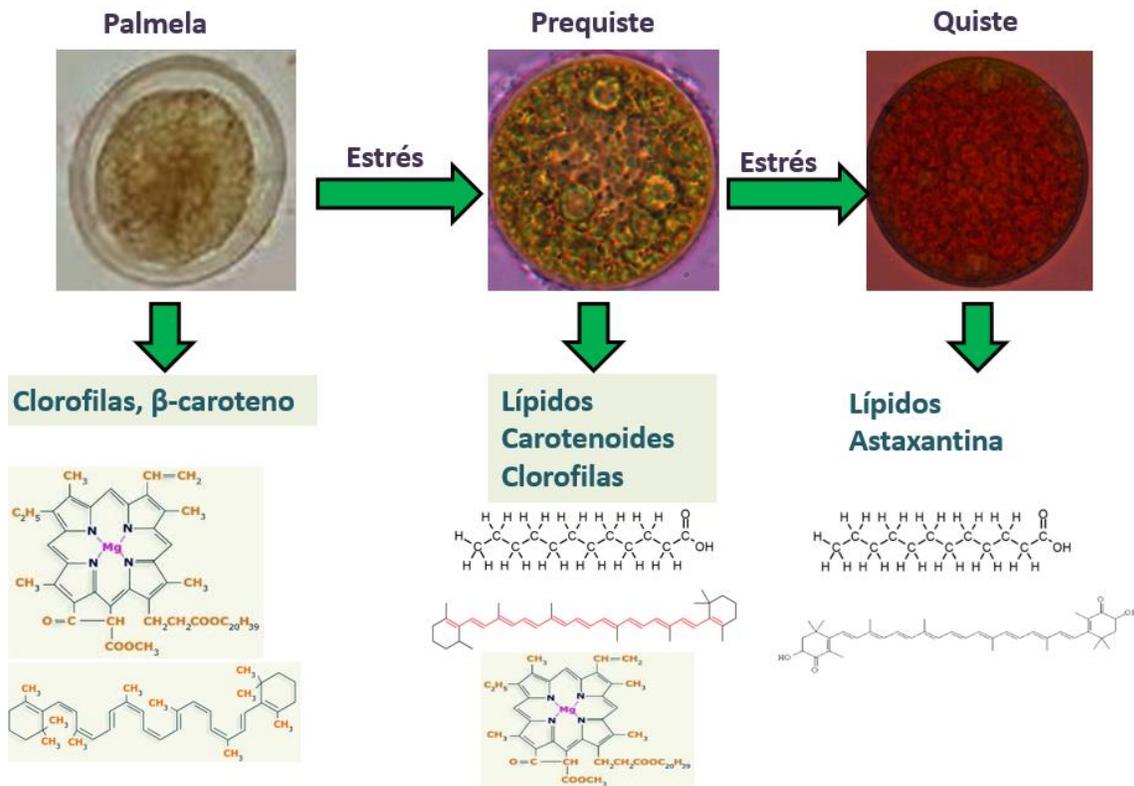


Fig. 4.- Cambios morfológicos en *H. pluvialis* y principales metabolitos producidos en condiciones de estrés

Comparada con el β-caroteno, la astaxantina presenta en su estructura dos grupos oxigenados adicionales en cada estructura cíclica, lo cual le confiere una extraordinaria capacidad antioxidante (500 veces mayor que el β-caroteno y la luteína). Por tal motivo la astaxantina tiene una gran importancia biológica, con aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y de los alimentos (Kang et al. 2005).

En la Figura 3 muestra la ruta metabólica de la producción de astaxantina a partir de β-caroteno en *H. pluvialis* (Cuellar et al. 2015).

2.6 Producción de *H. pluvialis* y obtención de carotenoides

Las condiciones de cultivo y la inducción a la carotenogenesis de *H. pluvialis* ya han sido estudiadas (Kang et al. 2007; Kobayashi et al. 1997), sin embargo, aún existen problemas, sobre todo la falta de optimización en el diseño de los fotobioreactores, la formulación de un medio donde se logre la máxima productividad celular y el implementar las condiciones adecuadas de estrés de tal forma que se logre la máxima producción de carotenoides (Fábregas et al. 2000). Actualmente se sabe que *H. pluvialis* requiere de nitrato ($0.5 - 1 \text{ g/L}$ de NO_3^-) como fuente de nitrógeno, fosfato como fuente de fósforo (alrededor de 0.1 g L^{-1} K_2HPO_4), una fuente de carbono en forma de HCO_3^- ya sea proveniente del CO_2 ambiental o de una fuente de carbono disuelta en el medio (carbonato, acetato etc.) y una serie de minerales necesarios en concentraciones bajas o traza (Borowitzka et al. 1991).

2.7 Escalamiento biotecnológico de *H. pluvialis* a nivel industrial

En el biorrefinamiento basado en microalgas, los procesos posteriores de alta energía y costos intensivos, como la ruptura celular y la extracción de productos intracelulares, se consideran los principales cuellos de botella tecnológicos. (Gunerken et al. 2015; Lee et al. 2015). Después de su cosecha de los sistemas de cultivo, las paredes celulares de las microalgas, debido a su robustez, probablemente representan la mayor barrera para la extracción del compuesto deseado. De hecho, las paredes celulares en *Chlorella* y *Haematococcus* spp son fuertes y de varias capas. Estas capas impiden la entrada a la célula de los solventes orgánicos convencionales como el hexano, evitando así el contacto adecuado entre el solvente orgánico y el componente intracelular de lípidos / carotenoides (Brennan y Owende 2010; Safi et al. 2014). Se han reportado muchos métodos de ruptura de la pared celular como homogeneización, ultrasonidos, microondas, solvente, ácido / base, químico Fenton, enzima hidrolítica y CO_2 supercrítico (ScCO_2), entre otros, para microalgas industriales incluyendo *Chlorella* y *Haematococcus*, para maximizar las eficiencias de extracción de metabolitos deseados como lípidos y carotenoides (Kim et al. 2014; Martínez-Guerra et al. 2014; Park et al. 2014, 2015). Sin embargo, la selección de los

métodos apropiados de disrupción y extracción celular depende en gran medida de las características biológicas y de la pared celular de la especie microalgal dada. (Praveenkumar et al. 2015). Las eficiencias de esos métodos, además, se ven afectadas significativamente por condiciones operativas tales como temperatura, presión, condición de biomasa (concentración, estado seco / húmedo, etapa de crecimiento) y escala (Rawat et al. 2011).

La eficiencia precisa de los diversos métodos de extracción desarrollados para los diferentes géneros de algas es muy difícil de lograr. Esto debido a que pocos estudios han proporcionado una visión general de la fisiología de las microalgas y la biología de la pared celular. (Damiani et al. 2006; Popper et al. 2011; Wayama et al. 2013). Actualmente faltan estudios identifiquen la relación de la estructura específica de la pared celular con los métodos de extracción, para la recuperación de metabolitos intracelulares valiosos, especialmente lípidos y carotenoides de microalgas.

2.8 Extracción de lo carotenoides y lípidos en *H. pluvialis*

El hexano es eficiente en extracción de carotenoides y lípidos de las microalgas (Ceron et al. 2018). Otra ventaja del uso del hexano como solvente utilizado en la extracción es que está aprobado para la extracción de aceite vegetal ya que no deja residuos tóxicos después de eliminarlo del compuesto deseado. (Kim et al. 2015).

El Hexano se puede usar eficientemente en la fase prequística de *H. pluvialis* para la extracción de carotenoides, es decir antes de formar la capa quística trilaminar. En un estudio realizado por Vo y colaboradores en 2017 se utilizó hexano para extraer carotenoides de *H. pluvialis* con buen resultado.

3. JUSTIFICACIÓN

H. pluvialis puede producir metabolitos bioactivos de alto valor terapéutico y cosmético como lípidos y carotenoides con concentraciones de alrededor de 50% y 4% de peso seco respectivamente. Actualmente, la extracción de los carotenoides de *H. pluvialis* a nivel industrial se realiza en la fase quística (o de hematocisto). La pared celular en esta fase es extremadamente dura y para poder romperla se utilizan fluidos supercríticos; incrementa aún más el costo de producción de los carotenoides extraídos (principalmente de astaxantina). El bajo rendimiento de carotenoides y el alto gasto energético durante el proceso de extracción de *H. pluvialis* en la fase quística, hacen que el valor de comercialización de los carotenoides obtenidos se incremente a niveles que son inaccesibles para la mayor parte de la población. Por otro lado, la extracción hexánica ha indicado una recuperación eficiente de lípidos y carotenoides de *H. pluvialis* debido a la liposolubilidad de ambos componentes. Es importante destacar, que la fase prequística de *H. pluvialis* ha mostrado una mayor facilidad de rompimiento de pared en comparación a la fase quística. Asimismo, la preparación de extractos hexánicos en fase prequística podría contener alrededor del 50% de lípidos y una mezcla de carotenoides donde la astaxantina representa más del 60% de este contenido. Los carotenoides y principalmente la astaxantina de *H. pluvialis* son productos apreciados y valorados por su alta capacidad antioxidante. De igual manera, si se logra definir las condiciones de cultivo, estrés para la producción de carotenoides (carotengensis) y fase ideal de extracción hexánica de *H. pluvialis*, podría obtenerse una actividad antioxidante similar a la astaxantina pura y a la par de facilitar el proceso de obtención y disminuir de manera significativa los costos de producción y por ende hacer estos compuestos más accesibles a la población.

4. HIPÓTESIS

El contenido de lípidos, carotenoides y la capacidad antioxidante del extracto hexánico de la biomasa de un cultivo de *Haematococcus pluvialis*, varía de acuerdo con la concentración y tiempo de exposición a un factor de estrés.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la concentración de Lípidos, carotenoides totales y la capacidad antioxidante de *Haematococcus pluvialis* en fase prequística usando un extracto hexánico

5.1 Objetivos particulares

- 1) Propagar *H. pluvialis* hasta fase estacionaria y depleción de nitrato
- 2) Determinar la cinética de biomasa producida de *H. pluvialis* en el cultivo
- 3) Cuantificar la cantidad de N-NO₃⁻ consumido en el cultivo a través del tiempo
- 4) Inducir estrés celular en *H. pluvialis* usando distintas concentraciones de Fe²⁺ como factor de estrés
- 5) Analizar la concentración de lípidos y carotenoides totales en la biomasa estresada a través del tiempo
- 6) Estimar la capacidad antioxidante de *H. pluvialis* a diferentes fases de estrés

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Cultivo de *H. pluvialis*

H. pluvialis CIB 68 se adquirió de la colección de microalgas del Centro de Investigación Biológica del Noroeste SC, Baja California Sur, México (CIBNOR). Se cultivó en un fotobiorreactor de 1 L, con iluminación constante (24h) a 40 μM fotón/ m^2s , a una temperatura de 25°C, y flujo de aire de 1 L/min. Una serie de cuatro fotobiorreactores se inocularon con 1×10^4 células/mL en fase de hematocisto.

El medio basal Bold (BBM) fue preparado de la siguiente manera: NaNO_3 2.94 mM, NaCl 0.43 mM, KH_2PO_4 1.29 mM, K_2HPO_4 0.43 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 mM, H_3BO_3 18.5 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.71 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 mM, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.44 mM, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 320 mM, MoO_3 1.57 mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.179 mM y Na_2EDTA 55.3 mM (Stein 1973).

6.2 Determinación del crecimiento celular

La densidad celular se midió usando un hematocitómetro de Neubauer. Para evaluar la producción de biomasa en peso seco de *H. pluvialis*. Para la determinación de peso seco se tomó una muestra de cultivo de 15mL y se pasó a través de un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/F de 47 mm (W_1) con un tamaño de poro de 0.7 μm , la presión diferencial de vacío se mantuvo a 35-55mm Hg y se secó a 70°C durante 48h (W_2) (Zhu y Lee 1997). El cálculo de peso seco se obtuvo usando la siguiente fórmula, donde DF es el factor de dilución.

$$\% \text{ Dw} = ((W_2 - W_1) / W_1) \times 100 \times \text{DF}$$

6.3 Evaluación de depleción de N-NO_3^-

Para evaluar el agotamiento o depleción de nitrato en los medios de cultivo se realizó un muestreo de cada fotobiorreactor cada 3 días y se determinó la concentración basándose en el método propuesto por Monteiro y colaboradores en 2003, tal como se indica a continuación:

En un tubo de ensayo de 13 x 100 mm sumergido en baño maría a 4°C se añadieron 1 mL de muestra de agua del cultivo (previamente centrifugada a 4000 rpm/5min) y 0.4 mL de ácido salicílico al 8% disuelto en ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se añadió 4 mL de hidróxido de sodio 2.5 N. Se mezcló bien y se midió la absorbancia a 410 nm (405-415) de longitud de onda, usando agua destilada como blanco. La curva de calibración fue realizada usando agua destilada con concentraciones crecientes de nitrato 15.5 ppm, 155 ppm y 310 ppm respectivamente usando como blanco agua destilada.

6.4 Inducción de estrés en *H. pluvialis*

Antes de inducir los cultivos al estrés se aseguró que hubiera depleción de NO^{-3} . Por último se diseñaron los tratamientos de la siguiente manera:

Control: Sin adición de Fe^{+2}

Tratamiento 1: Adición de FeSO_4 hasta una concentración de 0.45 mM de Fe^{+2} .

Tratamiento 2: Adición de FeSO_4 hasta una concentración de 1.35 mM de Fe^{+2} .

Tratamiento 3: Adición de FeSO_4 hasta una concentración de 4.05 mM de Fe^{+2} .

Posteriormente se añadió cloruro de sodio a una concentración de 17.1 mM, acetato de sodio a 4.4 mM. se aseguró la depleción del nitrógeno del medio. Los fotobiorreactores fueron sometidos a una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol-fotón/m}^2\text{s}$ por un período de 12 días (Vidhyavathi et al. 2008). Se tomaron muestras de biomasa por triplicado cada 3 días y se almacenaron en refrigeración a -4°C. Todos los tratamientos se evaluaron por triplicado. Los replicados de cada tratamiento se realizaron en fechas distintas.

Obtención de los extractos (Vo et al. 2017)

Se depositaron 5 mL de biomasa de cada tratamiento a un tubo de ensayo de 13 X 100 mm con tapa de rosca y se centrifugaron a 4000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante, se añadieron 6 perlas de vidrio y se realizó una ruptura celular agitando en vortex por 1 minuto. Se añadió 1000 µL de hexano y se agitó en vortex 30 segundos. Se añadieron 670 µL de agua destilada y se agitó en vortex 30 segundos. Por último, se añadieron 1400 µL de hexano, se agitó en vortex 30 segundos y se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos. La fase superior (extracto hexánico) presentó los lípidos y carotenoides disueltos de la muestra de biomasa.

6.5 Estabilidad de la biomasa de *H. pluvialis* durante el estrés

Para verificar la integridad de la biomasa durante el tiempo de estrés se realizó un análisis de peso seco de la biomasa de cada tratamiento mediante el método descrito en 6.2. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

6.6 Estimación de la viabilidad celular

Para estimar la permeabilidad celular se utilizó el método propuesto por (Gaff y Okong'ogola 1971; Brand et al. 1995). Se depositó 1 mL de biomasa centrifugada (4000 rpm/5 min) en 5 mL de azul de Evans al 0.25% por 8 horas. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se mezcló con 5 mL de agua destilada. Por último, se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de células viables y no viables. Las células viables fueron las que conservaron sus propiedades semipermeables y, por lo tanto, excluyeron el azul de Evans, mientras que las células muertas se pigmentaron a medida que el colorante penetró. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% P = 100 - [(T - A) \times 100 / T]$$

Donde:

% P = Porcentaje de células permeables

T = Células totales

A = Células azules

6.7 Análisis de lípidos

Se utilizó el método propuesto por Anschau et al. (2015). Se depositó en un tubo de ensayo 40 μ L del extracto hexánico y se añadieron 400 μ L de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó en vortex 30 segundos y se puso el tubo en baño maría a ebullición por 10 minutos. Posteriormente se sacó el tubo del baño maría y se enfrió en un baño de agua por 10 minutos. Se añadieron 1000 μ L de fosfovainillina, se agitó en vortex por 30 segundos y se incubó a 37°C por 15 minutos, para finalmente leer en espectrofotómetro a 530 nm. La curva de calibración se realizó siguiendo el mismo procedimiento, pero usando como estándar aceite de canola Sigma- Aldrich cat. 46961.

6.8 Análisis de carotenoides totales

La cuantificación de los carotenoides totales se realizó según el método propuesto por Vo *et al.* 2017. mediante espectrofotometría UV-Vis Beckman DU-650 (Vo et al.2017). Se tomó 1 mL del extracto hexánico y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman mod. DU-650 a 450 nm. Para la cuantificación se utilizó la siguiente fórmula:

$$mg \text{ Caroteno}/g = (A \times V \times 10^4) / (A^{cm^{-1}} \times 100 \times g)$$

Donde:

A = Absorbancia 450 nm

V = Volumen del extracto

$A^{cm^{-1}} = 2500$

g = Gramos de muestra

6.9 Determinación de capacidad antioxidante

La actividad antioxidante del extracto de carotenoides de cada tratamiento se determinó por el método 2,2 difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Kuskoski et al. 2005, Marxen et al. 2007). Este análisis fue una medida de TEAC (capacidad antioxidante equivalente de trolox).

7. Análisis estadístico

Los efectos de la concentración de Fe (II) y su tiempo de exposición en *H. pluvisalis* fueron analizados mediante ANOVA de una vía y análisis de contraste de Tukey a un nivel de significancia de 0.05 usando el programa SPSS v.23

8. RESULTADOS

8.1 Cultivo de *H. pluvialis* y cinética de crecimiento

El crecimiento máximo de *H. pluvialis* fue estimado y corroborado a los 17 días de cultivo mediante la cinética de crecimiento basada en la concentración de materia seca (fig. 7) y densidad celular (fig. 8). Cabe destacar que la densidad celular se mantuvo en el orden de 10^6 células/mL y obtuvo una concentración final de peso seco de 1.2 g/L de biomasa. Por otro lado, en los fotobiorreactores no se observó la formación de biofilm lo cual facilitó el paso de luz. Por otro lado este paso aseguró la homogeneidad en de la densidad celular en los distintos fotobiorreactores; lo cual era un requisito indispensable previo al desarrollo de los tratamientos y a la fase de estrés.

En la figura 8 se observó que en los distintos replicados del cultivo de *H. pluvialis* se conservó una densidad celular y una tendencia estadísticamente igual. ($n=3$. $\alpha=0.05$)

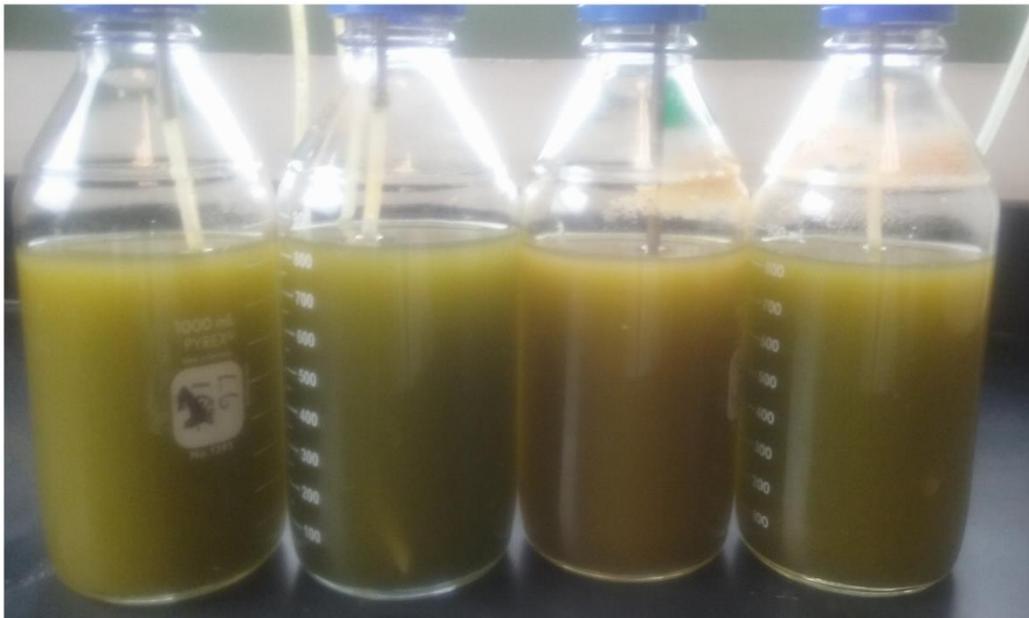


Fig. 6.- Fase estacionaria (17 días de cultivo) del cultivo de *H. Pluvialis*.

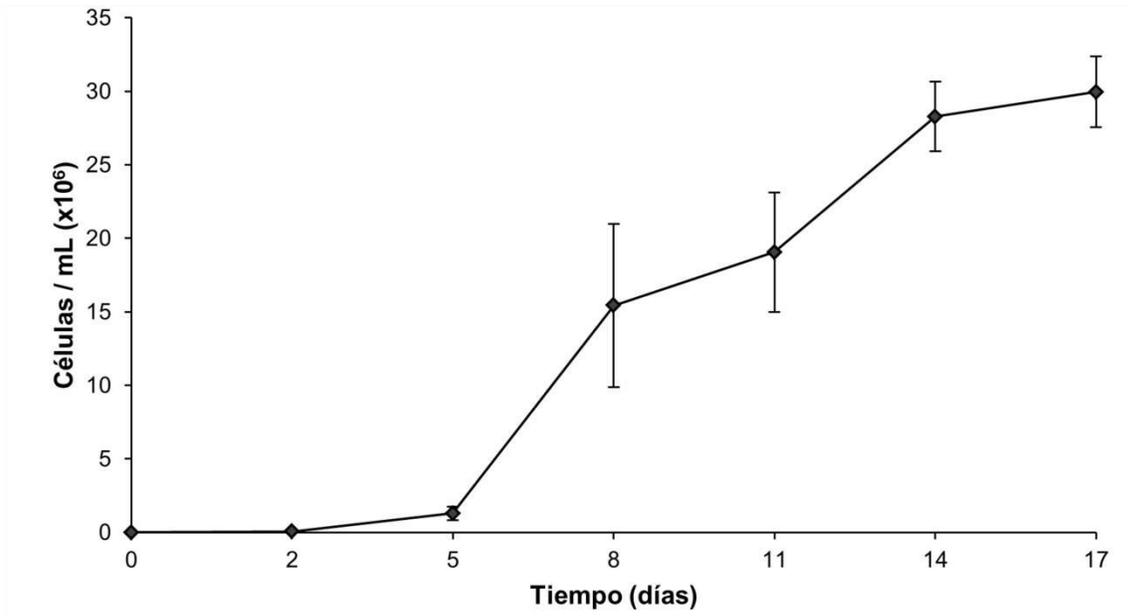


Fig. 7.- Cinética de crecimiento de *H. pluvialis*

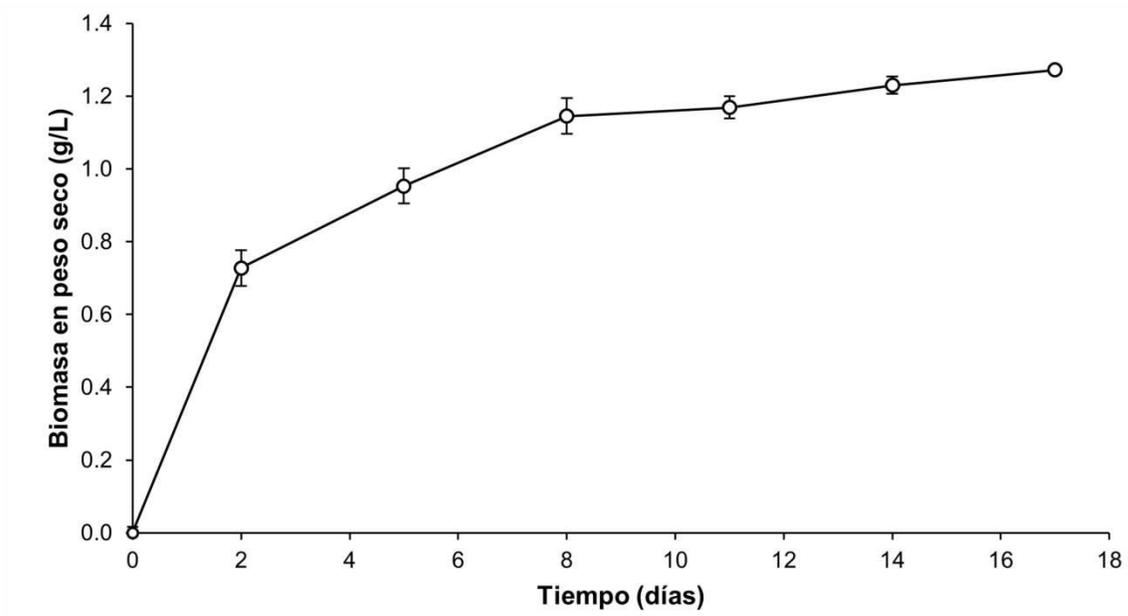


Fig. 8.- Concentración peso seco de *H. pluvialis* durante el cultivo

8.2 Depleción de N-NO₃⁻

Los resultados del análisis de la concentración de nitrato en los cultivos indicaron una disminución conforme al tiempo de máximo crecimiento celular (día 17 del cultivo) (fig. 9). La concentración inicial fue de 2.9mM y alcanzó un valor final de depleción de 0.001mM (99.97% de consumo de nitrógeno). Asimismo, la cinética de consumo de nitrato señala que al día 1 hasta el día 8 de cultivo existió un marcado aumento en el consumo de nitrato. No obstante, a partir del día 8 de cultivo se observa una disminución en el consumo de nitrato. Es importante destacar que cuando existe la depleción de nitrato se inicia el estrés celular en *H. pluvialis*, lo que remarca la importancia de determinar el tiempo requerido donde se obtiene el crecimiento celular máximo, el cual bajo las condiciones de este estudio se obtuvo a partir de 17 días de cultivo.

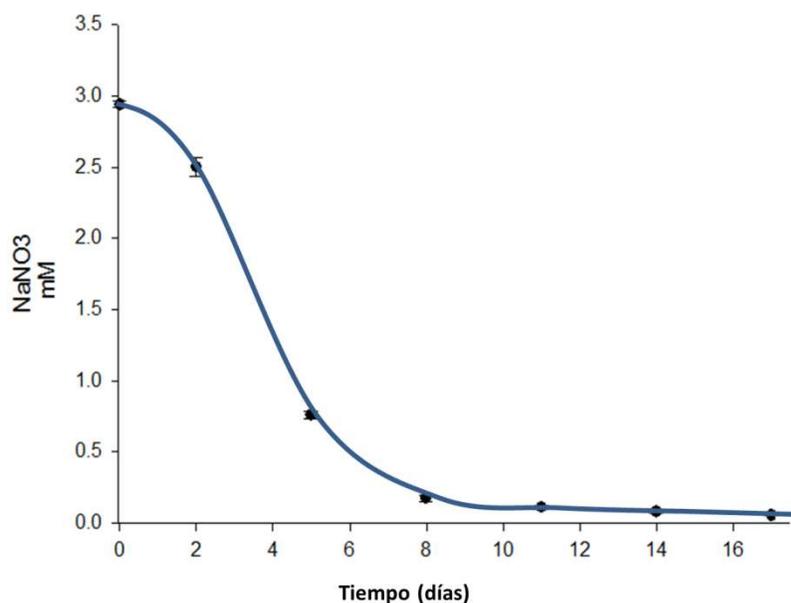


Fig. 9.- Concentración de nitrato a través del tiempo de cultivo de *H. pluvialis*

8.3 Inducción al estrés

Al llegar a la depleción de nitrato y al inducir a estrés, se observó a través del tiempo de cultivo un cambio en la coloración en los fotobiorreactores, con tonalidades que pasaron del verde a el naranja con una tonalidad oscura tal y como se muestra en la figura 10. Al no obtenerse una coloración roja en el cultivo, se puede indicar que se evitó la fase quística característica del estrés y carotenogénesis de *H. pluvialis* misma que en este estudio se buscó evitar a razón de que es la forma que presenta resistencia a la extracción con solventes orgánicos.

Durante el tiempo de estrés se observaron (fig. 11) cambios en la morfología celular tanto en el cultivo control, como en los cultivos inducidos a estrés con Fe^{2+} . Unos propios del estrés nutricional por falta de nitrógeno y otros debido al aumento en las concentraciones de Fe^{2+} .

La materia seca durante el tiempo de estrés se mantuvo constante sin cambios significativos, por lo que no se observó pérdida de biomasa por desintegración celular.

En el tratamiento 3 se observó una exudación de las células, tono naranja más oscuro el cual probablemente indique un mayor estrés así como un endurecimiento en la pared celular



Fig.10.- Cambio en la coloración de los cultivos de *H. pluvialis* a 12 días de estrés por los distintos tratamientos.

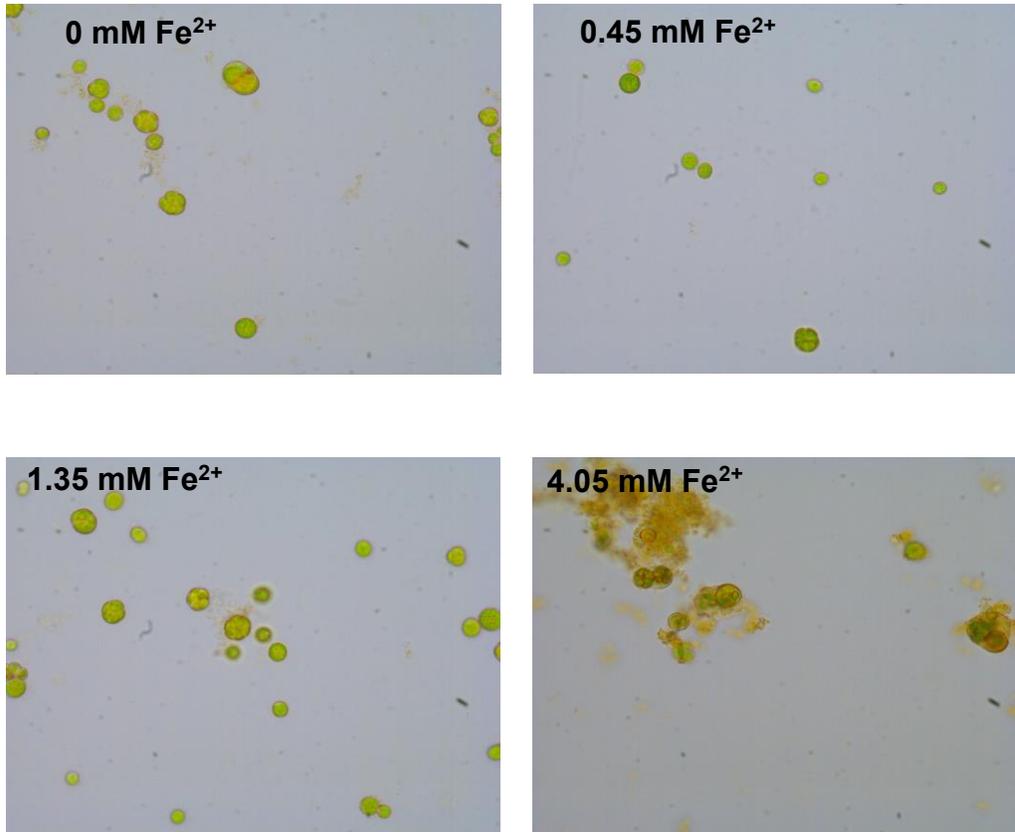


Fig. 11.- *H. pluvialis* a los 12 días de estrés, en los diferentes tratamientos (40x)

Al término del tratamiento de estrés (12 días) se observó que un aumento en las concentraciones que influyó en la morfología celular. Asimismo, en el tratamiento a 4.05 mM Fe^{2+} se observaron células rodeadas de compuestos extracelulares. Cabe destacar, que el contenido de materia o peso seco durante el tiempo de estrés se mantuvo constante y sin cambios significativos, por lo que no se observó pérdida de biomasa o desintegración celular.

8.4 Estabilidad de la biomasa durante el estrés

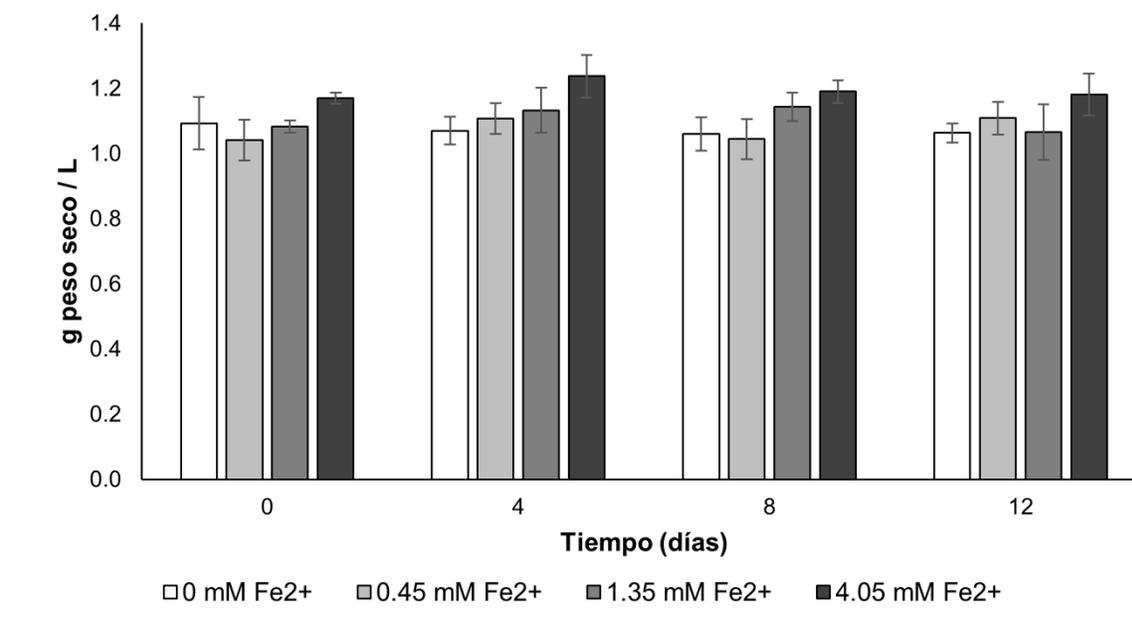


Fig.12.- Peso seco de *H. pluvialis* en los diferentes tratamientos, durante el tiempo de estrés. n=3. ANOVA de una vía. (Tukey, $\alpha=0.05$).

8.4 Viabilidad celular

El análisis de permeabilidad celular con la prueba de azul de Evans indicó la viabilidad celular durante los distintos tratamientos de estrés. En las fig. 13, se muestra la diferencia entre una célula viable (sin permeabilidad) y una célula no viable (permeable)

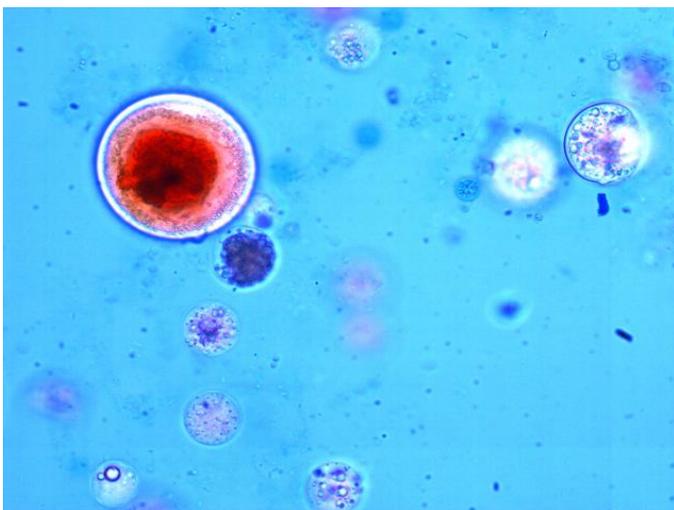


Fig.13.- Célula viable (naranja) junto a célula no viable (azul) 40x

En la fig. 14, Se observó que usando concentraciones de 0 a 1.35 mM de Fe^{2+} para inducir a estrés no se vio afectada la permeabilidad celular; Sin embargo, se destaca que a una concentración de 4.05 mM se pudo observar permeabilidad celular significativa a partir del día 4.

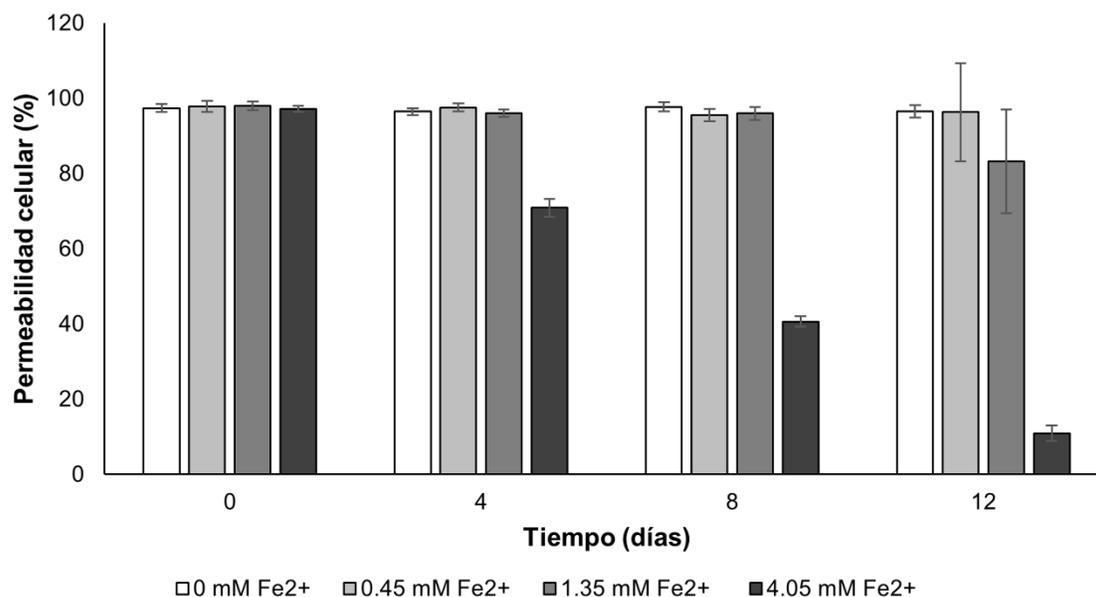


Fig. 14.- Gráfico de permeabilidad celular con respecto al tiempo de estrés. n=3. ANOVA de una vía. (Tukey, $\alpha=0.05$).

8.5 Obtención del extracto en los diferentes periodos de estrés

La extracción hexánica fue eficiente mientras la permeabilidad celular lo permitió. La característica pigmentante de los carotenoides pudo en cierta forma manifestar visiblemente si pasaron a la fase hexánica o se quedaron en el sedimento.

En la figura 15 a, se puede ver una extracción eficiente. La fase superior (naranja) extrajo los compuestos no polares extraíbles, como son los carotenoides y los lípidos. La fase inferior contenía los compuestos polares (agua).

En el caso de baja permeabilidad celular, la pigmentación producida por los carotenoides fue repartida entre la fase polar (acuosa) y no polar (lipídica). Como se muestra en la figura 15 b, en donde se observa el paquete celular en la interfase.

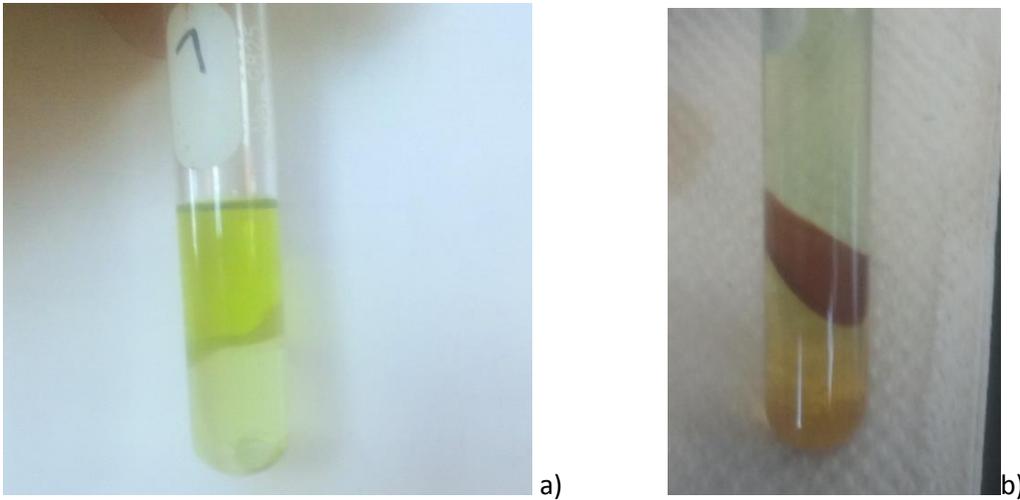


Fig. 15.- Extracto hexánico de los carotenoides en fase prequística (a); extracción en fase quística (b)

8.5 Análisis de lípidos durante el estrés celular de *H. pluvialis*

Hasta el día 8 de estrés, el contenido de lípidos en *H. pluvialis*, aumentó en todos los tratamientos (0, 0.45, 1.35 y 4.05 mM de Fe^{2+}); sin embargo, como puede verse en la figura 16, el tratamiento de 0 y 0.45 mM de Fe^{2+} , mantuvieron la concentración de lípidos hasta el día 12. El tratamiento 1.35 y 4.05 mM de Fe^{2+} disminuyeron su concentración de lípidos del día 8 al día 12.

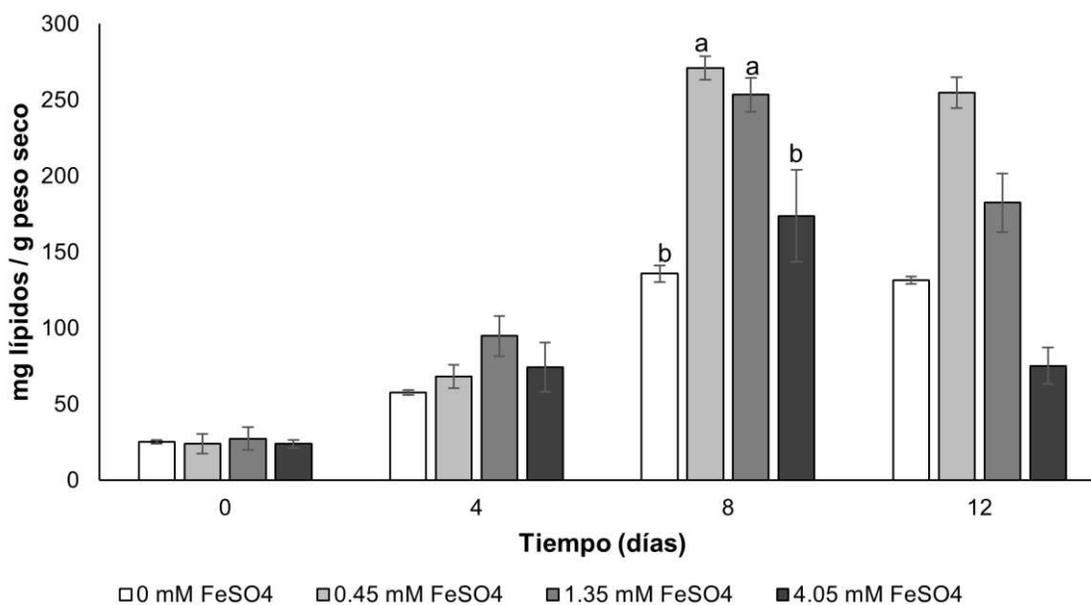


Fig. 16.- Concentración de lípidos en los diferentes periodos de estrés. Los valores muestran las medias (n=3) \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05

8.6 Análisis de carotenoides totales en *H. pluvialis*

Como se observa en la figura 17, los tratamientos 0.45, 1.35 y 4.05 mM de Fe²⁺ incrementaron su concentración de carotenoides totales hasta llegar a un máximo en el día 8 de 27.72 ± 2.37 mg/g en el tratamiento 0.45 mM Fe²⁺ y 30.88 ± 2.54 mg/g en el tratamiento 1.35mM Fe²⁺. En cuanto al tratamiento 0 mM Fe²⁺ se observó un incremento hasta el día 12, mientras que el tratamiento 4.05 mM Fe²⁺ conservó su concentración del día 8 al día 12.

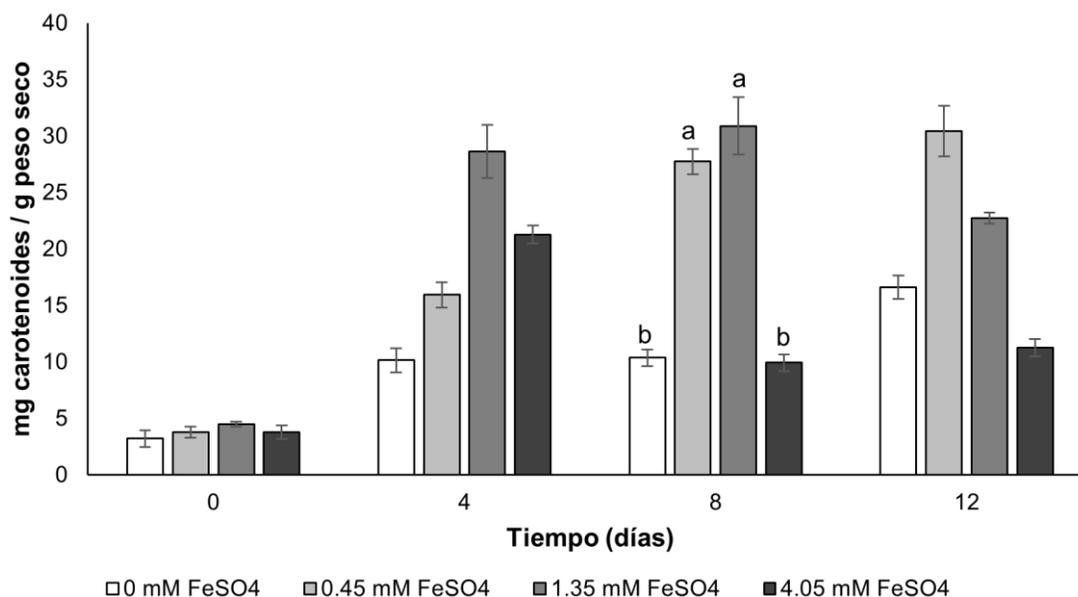


Fig. 17.-. Acumulación de carotenoides en los diferentes periodos de estrés. Los valores muestran las medias (n=3) \pm desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias Significativas a un nivel de confianza de 0.05.

8.7 Análisis de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante expresada como % de inhibición del radical DPPH (fig. 18) presentó un máximo significativo en el tratamiento 1.35 mM Fe²⁺ con respecto a todos los demás tratamientos. Se obtuvo un pico máximo en el día 8 de todos los tratamientos, excepto el 0 mM Fe²⁺ el cual se incrementó hasta el día 12. Los tratamientos 0.45 y 4.05 mM Fe²⁺ mantuvieron su valor constante del día 8 al día 12; sin embargo, el tratamiento 1.35 mM Fe²⁺ tuvo una reducción significativa en el mismo lapso.

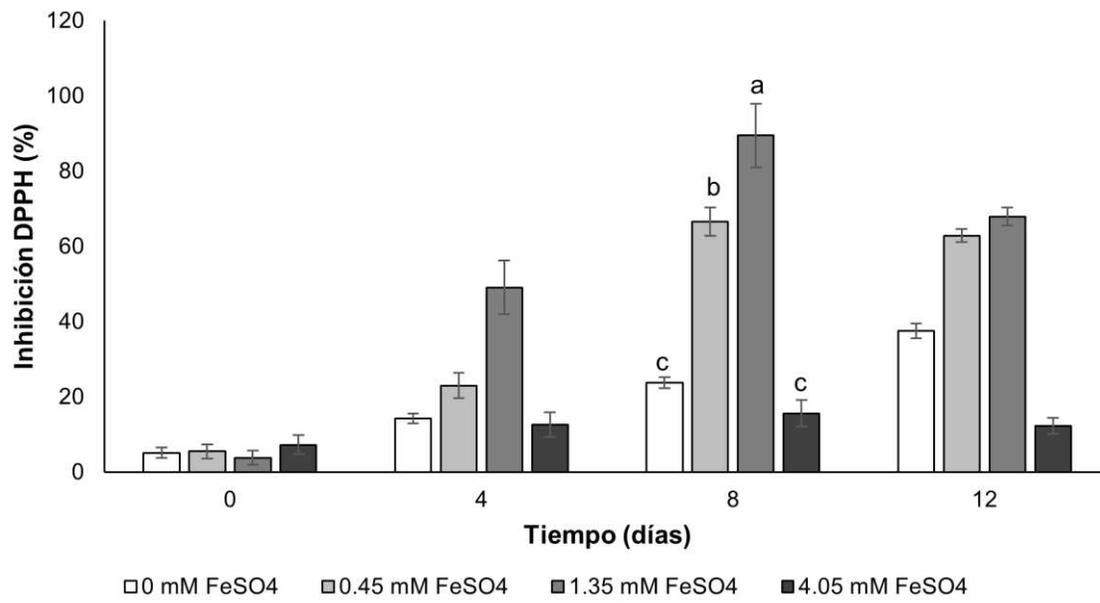


Fig. 18.- Capacidad antioxidante como Inhibición DPPH en los diferentes periodos de estrés. Los valores muestran las medias (n=3) ± desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias significativas a un nivel de confianza de 0.05

Los valores de capacidad antioxidante obtenidos como TEAC, muestran un valor máximo en el tratamiento 1.35 mM Fe²⁺ en el día 8 de estrés. Todos los tratamientos mostraron un valor máximo en el día 8 y un decremento significativo desde el día 8 al 12 en los tratamientos 0 mM Fe²⁺ y 1.35 mM Fe²⁺. (Fig. 19)

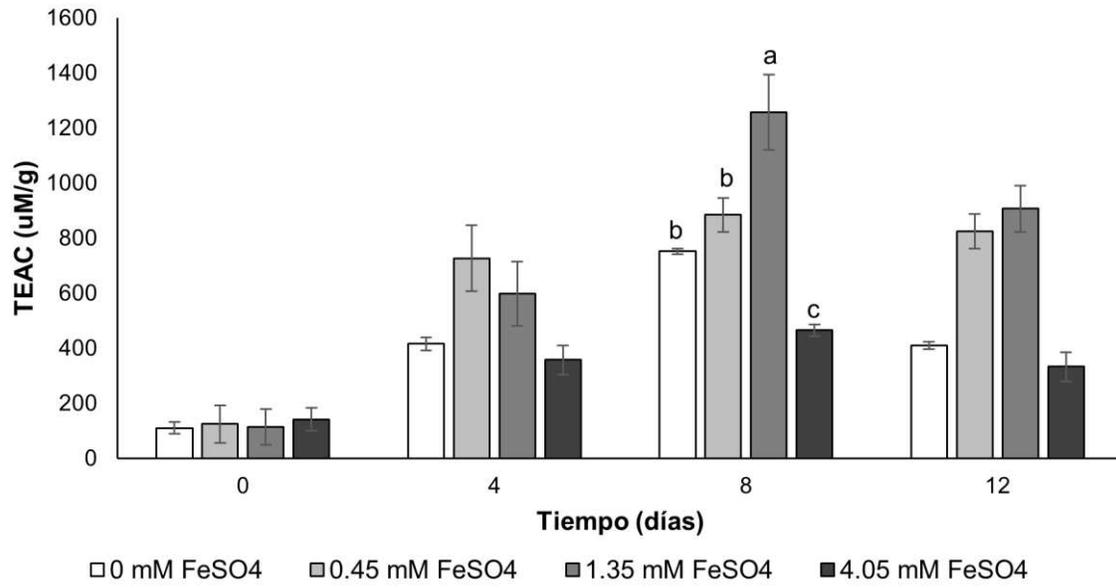


Fig.19. - Capacidad antioxidante como TEAC en los diferentes periodos de estrés. Los valores muestran las medias (n=3) ± desviación estándar. Diferentes letras indican diferencias Significativas a un nivel de confianza de 0.05

9. DISCUSIONES

La producción máxima de biomasa obtenida fue de 1.2 g/L. En un trabajo anterior se obtuvieron rendimientos desde 0.63 g/L (Katsuda et al. 2004) hasta 1.1 g/L (Zhang, et al. 2016). Esto demuestra que el rendimiento fue comparable con trabajos previos.

El tiempo de cultivo hasta llegar a la fase estacionaria fue de 17 días, con una densidad celular en el orden de 10^6 . Este tiempo es menor que el obtenido en trabajos previos como en el realizado por Niño et al. 2016, en donde se obtuvo densidades celulares en el orden de 10^5 , lo que indica que las condiciones de cultivo en el presente trabajo fueron mejores en cuanto a productividad celular.

El contenido máximo de lípidos fue de 270 mg/g. En un estudio publicado por Doria et al. (2018) en fase cística, fue de 198 mg/g de peso seco. También obtuvo una concentración de carotenoides de 33.6 mg/g, ambos parámetros concuerdan con los obtenidos el presente trabajo (30.88 mg/g). Otro estudio concluyó que el rendimiento de carotenoides fue 24.5 mg/g (Vidhyavathi et al. 2008). Dicha comparación manifiesta que en la presente investigación se obtuvo una concentración de lípidos igual o mayor a trabajos anteriores.

En cuanto a la capacidad antioxidante, en este trabajo se logró obtener 1256 μM eq trolox/g en 8 días de estrés. En un trabajo anterior (Rudi. 2014), se obtuvo 2000 μM eq trolox/g, en 16 días de estrés. Esto indica que aunque la capacidad antioxidante fue menor que comparada con otros trabajos, esta fue compensada con el menor tiempo de cultivo. Con un aumento en productividad de 8 días.

En el tratamiento con mayor concentración de Fe^{2+} (4.05 mM), se presentó resistencia a la extracción debido a la formación de quistes, lo cual explica que hayan bajado los parámetros de lípidos, carotenoides y capacidad antioxidante en dicho tratamiento.

10. CONCLUSIONES

La depleción de nitrato en el medio basal Bold y crecimiento máximo de *H. pluvialis* previo a la formación de la fase cística se obtuvo a 17 días de cultivo.

La máxima concentración de lípidos y carotenoides en fase prequística de *H. pluvialis* para las distintas concentraciones de Fe^{2+} (0, 0.45mM, 1.35mM y 4.05mM) se generó tras un periodo de inducción de estrés de 8 días.

Las condiciones para inducir el estrés e inducción de la carotenogenesis en *H. pluvialis* más efectivas se obtuvo utilizando una concentración de Fe^{2+} de 1.35 mM durante un periodo de tratamiento de 8 días.

La máxima capacidad antioxidante del extracto hexánico fue obtenida bajo el tratamiento de 1.35 mM de Fe^{2+} y 8 días.

PERSPECTIVAS

La demanda cada vez mayor de carotenoides de origen natural en la industria nutracéutica y cosmética, así como el requerimiento de lípidos va cada vez más en aumento, por tal motivo la optimización en las condiciones de cultivo, inducción rápida del estrés y extracción de carotenoides en *H. pluvialis* en una fase celular adecuada, disminuiría los gastos de producción y por ende el valor comercial tanto de los metabolitos antes mencionados. Aunado a ello la producción a nivel industrial de los mismos se ve favorecida por el uso de un solvente como el hexano, que ya está aprobado y estandarizado en extracciones de aceite vegetal comestible a gran escala, por lo que no habría necesidad de hacer demasiadas adecuaciones a la línea de producción.

Se sugiere continuar usar el extracto con la optimización conseguida en la presente investigación en ensayos cosméticos a nivel cutáneo, siendo el reto principal optimizar la permeabilidad del extracto en piel, favoreciéndose así, de las propiedades antioxidantes del mismo.

BIBLIOGRAFIA

- Abalde J, Orosa G, Torres, Cid E. 1999. Biotecnología y aplicaciones de microorganismos pigmentados: IV Simposio científico en biología celular y molecular. 95-117. ISBN: 84-95322-04-8
- Abinandan S, Shanthakumar S. 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52:123-132.
- Borowitzka, M.A., Huisman, J.M. & Osborn, A. 1991 Culture of the astaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis* 1. Effects of nutrients on growth and cell type. *Journal of Applied Phycology*. 3:295.
- Borowitzka M. 2013. High-value products from microalgae - their development and commercialization. *Journal of Applied Phycology* 25:743-756.
- Brand J. J., Kenneth R.D. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. *Nova Hedwigia* 79: 175-189.
- Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae- a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577.
- Burhenne N, Tischner R. 2000. Isolation and characterization of nitrite-reductase-deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Planta* 211:440-445.
- Cai T, Park SY, Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 19:360-369.
- Ceron C, Victoria C, López G, María J, Sevilla F, Grima EM. 2018. *Methods in Molecular Biology*. Chapter 6. P . 1852.
- Chu WL. 2012. Biotechnological applications of microalgae. *International e - Journal of Science, Medicine & Education* 6:24-37.
- Collins A.M., Howland D.T.J., Han D., Hu Q., Beechem T. E., Timlin J. A. 2011. Carotenoid Distribution in Living Cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS ONE*, 9:6

- Córdoba N.A., Acero N.R., Duque L.B., Jimenez J.A., Serna J.A.J. 2014. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. UG Ciencia. 21.
- Cuellar-Bermudez, S.P., Aguilar-Hernández I., Cardenas-Chavez D. L., Ornelas-Soto N., Romero-Ogawa M.A., Parra-Saldivar R. 2015. Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. Society for Applied Microbiology. 8: 190-209
- Cysewski G. R., Todd R. 2004. Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products - Species of High Potential: *Haematococcus*. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Ed. Amos Richmond. 14-15.
- Damiani MC, Leonardi PI, Pieroni OI, Cáceres EJ. 2006. Ultrastructure of the cyst wall of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination. Phycologia 45:616-623.
- Doria E., Temporiti M.E.E., Damiani M.C., Popovich C.A. 2018. Influence of Light Stress on the Accumulation of Xanthophylls and Lipids in *Haematococcus Pluvialis* Grown under Autotrophic or Mixotrophic Conditions. CCALA 1081. Journal of Marine Biology and Aquaculture. 4: 30-35.
- Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A. 2000. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. Applied Microbiology and Biotechnology 53:530-535.
- Gaff DF, Okong'o-ogola O. 1971. The use of non-permeating pigments for testing the survival of cells. Journal of Experimental Botany 22:756-758.
- Goodwin T., Britton G., 1988. Distribution and analysis of carotenoids, in: T.W. accompanied by a decrease in the chlorophyll content of the cells. Ed. Plant Pigments, Academic Press. pp. 61–132.
- Gouveia L, Bandarra NM, Franco JM, Raymundo A. 2013. Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. Algal Research 2:164-173.

- Gunerken E, D'Hondt E, Eppink MH, Garcia-Gonzalez L, Elst K, Wijffels RH. 2015. Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances* 33:243-260.
- Hernández-Pérez A. y Labbé J. I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49: 157-173.
- Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H. et al. 2005. Comparison of heterotrophic and photoautotrophic induction on astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68: 237.
- Kang, C.D., Lee, J.S., Park, T.H. et al. 2007. Complementary limiting factors of astaxanthin synthesis during photoautotrophic induction of *Haematococcus pluvialis*: C/N ratio and light intensity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74: 987
- Katsuda T., Lababpour A., Shimahara K., Katoh S. 2004. Astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under illumination with LEDs. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 81–86
- Kim D.Y., Park J.Y., Choi S.A, Oh Y.K., Lee I.G., Seo Y.W., Han J.I., 2014. The effects of microalgal cell disruption via FeCl₃-based synergistic effect between Fenton-like and Lewis acid reaction for lipid extraction. *Algal Research* 6:86-90.
- Kim D.Y., Vijayan D., Praveenkumar R., Han J.I., Lee K., Park J.Y, Chang W.S., Lee J.S., Oh Y.K. 2015. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.107>
- Kobayashi, M., Kurimura, Y. & Tsuji, Y. *Biotechnology Letters*.1997. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters*. 19: 507-509
- Koller M, Muhr A, Braunegg G. 2014. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research* 6:52-63.
- Kuskoski, EM, Asuero, AG, Troncoso, AM, Mancini-Filho, J., Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en

pulpa de frutos. Food Science and Technology. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>

- Lee YC, Lee K, Oh YK. 2015. Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* 184:63-72.
- Lemoine, Y. & Schoefs, B. 2010. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*. 106: 155.
- Martínez ME, Sánchez S, Jiménez JM, El-Yousfi F, Muñoz L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73:263-272.
- Martinez-Guerra E, Gude VG, Mondala A, Holmes W, Hernandez R, 2014. Microwave and ultrasound enhanced extractive-transesterification of algal lipids. *Applied Energy* 129:354-363.
- Marxen, K.; Vanselow, K.H.; Lippemeier, S.; Hintze, R.; Ruser, A.; Hansen, U.-P. 2007. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors*. 7, 2080-2095
- Monteiro MIC, Ferreira FN, De Oliveira NMM, Avila AK. 2003. Simplified version of the sodium salicylate method for analysis of nitrate in drinking waters. *Analytica Chimica Acta* 477:125-129.
- Panis J. y Carreon R. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*. 18: 175-190.
- Park JY, Lee K, Choi SA, Jeong MJ, Kim B, Lee JS, Oh YK. 2015. Sonication-assisted homogenization system for improved lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy* 79:3-8.

- Park JY, Oh YK, Lee JS, Lee K, Jeong MJ, Choi SA, 2014. Acid-catalyzed hot-water extraction of lipids from *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 153:408-412.
- Popper ZA, Michel G, Hervé C, Domozych DS, Willats WG, Tuohy MG, Kloareg B, Stengel DB. 2011. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology* 62:567-590.
- Praveenkumar R, Lee K, Lee J, Oh YK. 2015. Breaking dormancy: an energy efficient means of recovering astaxanthin from microalgae. *Green Chemistry* 17:1226-1234.
- Pulz O, Gross W, 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 65:635-48.
- Hu Q. 2004. Environmental effects on cell composition.. In: Richmond A, editor. *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford: Blackwell Science Ltd, p 83–93.
- Rawat I, Kumar RR, Mutanda T, Bux F. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88:3411-3424.
- Rudi L, Cepoi L, Miscu V. 2014. Biomass and carotenoid production by green alga *Haematococcus pluvialis* during the life cycle under the influence of Co (II) Schiff base complexes. *Agris*. 18; 52-74.
- Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 35:265-278.
- Vandamme D, Foubert I, Muylaert K. 2013. Flocculation as a low-cost method for harvesting microalgae for bulk biomass production. *Trends in Biotechnology* 31:233-239.
- Vidhyavathi R., Venkatachalam L., Sarada R., Ravishankar G.A., 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions, *Journal of Experimental Botany*. 59: 1409–141

- Vo T, Tran S, Nguyen P, Mai T .2017. Growth, carotenoid production, antioxidant capacity and lipid accumulation of *Haematococcus* sp. under different light intensities. *American Journal of Plant Biology* 2:142-147.
- Vonshak A., Torzillo G., 2004. Environmental stress physiology, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Black- well Publishing Ltd., pp. 57–82
- Wang B, Li Y, Wu N, Lan CQ. 2008. CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* 79:707-718.
- Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied biochemistry and biotechnology* 162:1174-1186.
- Wayama M, Ota S, Matsuura H, Nango N, Hirata A, Kawano S. 2013. Threedimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One* 8:53618.
- Zhang C., Zhang L. Jianguo Liu. 2016. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*. 107: 75:81.
- Zhu CJ, Lee YK. 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. *Journal Applied of Phycology* 9:189-194.
- Zhu L.D., Li Z.H. 2016. strategies for Lipid Production Improvement in Microalgae as a Biodiesel Feedstock. 16: 1-8

RESUMEN BIOGRÁFICO

Candidato para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Tesis: Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de lípidos y carotenoides totales en un extracto hexánico de *Haematococcus pluvialis* en distintos periodos de estrés

Campo de estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacido en Monterrey N. L. el 29 de Julio de 1971, hijo de David Homero Guajardo Gutiérrez y Olga Clara Barbosa Cañamar.

Educación: Egresado de la Escuela Industrial y Preparatoria Técnica Álvaro Obregón como Técnico Laboratorista. Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Maestría en Ciencias con Orientación en Química Analítica Ambiental (FCQ, UANL). Diplomado en Ingeniería Bioquímica y Diplomado en Medicina Biológica (UANL, FCB). Diplomado en Unidades Químicas de Concentración (Facultad de medicina UANL). Diplomado en Naturopatía y Medicina Alternativa (Instituto Maurer)

Experiencia Profesional: Analista de Calidad en Grupo RAGASA, responsable del Laboratorio de Análisis de Alimentos en Maricultura (Ecología, FCB, UANL), Jefe del Laboratorio de Control de Calidad en Lala Monterrey S.A. de C.V. Jefe de Calidad y Jefe de Producción en Alimentos Balanceados La Hacienda S.A. de C.V., Jefe de Producción de Alimento para Ganado en Sukarne S.A. de C.V., Escobedo N.L.