

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

**CARRERA:
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
CULTIVO MIXOTRÓFICO DE LA MICROALGA *Coenochloris sp.* CON
FRACCIÓN SOLUBLE DE PAPA (*Solanum phureja L*) PARA LA
OBTENCIÓN DE PIGMENTOS (CAROTENOIDES).**

**AUTORA:
EMILIA LUCÍA RODRÍGUEZ IZA**

**TUTOR:
LUIS ALBERTO VALDÉS SILVERIO**

Quito, mayo de 2016

Cesión de derechos de autor

Yo Emilia Lucía Rodríguez Iza, con documento de identificación N° 1715125371, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de grado intitulado: “Cultivo mixotrófico de la microalga *Coenochloris sp.* con fracción soluble de papa (*Solanum phureja L*) para la obtención de pigmentos (carotenoides)”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición autora reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Emilia Lucía Rodríguez Iza

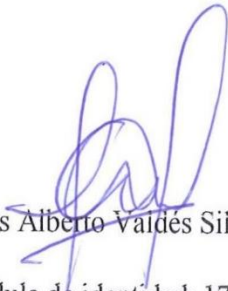
Cédula: 171512537-1

Fecha: Quito, 26 de mayo del 2016

Declaratoria de coautoría del docente tutor

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación Cultivo mixotrófico de la microalga *Coenochlois sp.* con fracción soluble de papa (*Solanum phureja L*) para la obtención de pigmentos (carotenoides) realizado por Emilia Lucía Rodríguez Iza, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerado como trabajo final de titulación.

Quito, mayo 2016



Luis Alberto Vaidés Silverio

Cédula de identidad: 1754572822

Dedicatoria

Dedico este proyecto de investigación a los tres pilares más importantes en mi vida,
Dios, mis padres y mi familia.

Lucía Rodríguez

Agradecimientos

Al Dr. Ever Morales, Msc. Elena Coyago, Msc. Daniel Acurio, Dr. Luis Valdés,
por el apoyo brindado para que este proyecto sea finalizado con éxito.

Lucía Rodríguez

Índice

Introducción	1
Capítulo 1. Marco conceptual	4
1.1 Importancia de la microalgas	4
1.2 Taxonomía y Clasificación de microalgas	4
1.2.1 Microalgas Clorofitas.....	5
1.2.1.1 <i>Coenochloris sp.</i>	5
1.2.2 Composición bioquímica de Clorofitas.....	5
1.2.3 Reproducción de Clorofitas.....	6
1.3 Cultivo mixotrófico	7
1.3.1 Uso de fotobiorreactores	8
1.4 Pigmentos.....	9
1.4.1 Clorofilas.....	9
1.4.1.1 Tipos de clorofilas.....	9
1.4.2 Carotenoides.....	10
1.4.2.1 Tipos de carotenoides.....	11
1.4.2.1.1 Carotenos	11
1.4.2.1.2 Xantófilas	12
1.5 Fracción soluble de papa (<i>Solanum phureja L.</i>).....	13
1.5.1 Generalidades.....	13
1.5.2 Composición	14
1.5.3 Uso y aplicación de fracción soluble de papa (FSP).....	15
Capítulo 2. Metodología	16

2.1	Diseño experimental.....	16
2.1.1	Cultivo de <i>Coenochloris sp.</i>	16
2.1.1.1	Identificación en microscopio óptico.....	16
2.1.1.2	Recuento celular.....	16
2.1.2	Medio de cultivo	18
2.1.3	Carotenoides.....	20
2.1.3.1	Cromatografía de columna en fase normal	22
2.1.3.2	Saponificación.....	22
2.1.4	Análisis de carotenoides por HPLC	23
2.1.5	Análisis Estadístico	24
	Capítulo 3. Resultados y discusión	25
3.1	Cultivo de <i>Coenochloris sp.</i>	25
3.1.1	Escalado sistema autotrófico.....	26
3.2	Medio de cultivo	29
3.3	Extracción de carotenoides	33
3.4	Concentración de carotenoides totales	36
3.5	Separación de carotenoides.....	48
3.6	Análisis de carotenoides por HPLC	51
	Conclusiones	54
	Recomendaciones.....	55
	Referencias.....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Coenochloris sp.</i>	5
Tabla 2. Composición bioquímica de una microalga <i>Chlorophyta</i>	6
Tabla 3. Aporte nutricional de <i>Solanum phureja L.</i>	14
Tabla 4. Análisis bromatológicos de los extractos solubles de papa (<i>Solanum phureja L.</i>).....	15
Tabla 5. Resumen de condiciones para escalamiento de la microalga en condiciones autotróficas.....	17
Tabla 6. Resumen parámetros de elaboración FSP.....	20
Tabla 7. Longitudes de onda definidas para la identificación de los principales compuestos fotosintéticos.....	21
Tabla 8. Condiciones específicas para el uso de HPLC.....	23
Tabla 9. Condiciones para la preparación de soluciones estándar.....	24
Tabla 10. Valores R. Regresiones lineales.....	47
Tabla 11. Colores de principales pigmentos fotosintéticos.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Estructura química de clorofila a y b.....	10
Figura 2. Estructura de los principales carotenoides.....	11
Figura 3. Estructura química de algunos carotenos	12
Figura 4. Estructura química de algunas xantófilas	13
Figura 5. Resumen del escalado, sistema autotrófico de <i>Coenochloris sp.</i>	18
Figura 6. Protocolo para la elaboración de fracción soluble de papa (FSP)	19
Figura 7. Características de las colonias del género <i>Coenochloris</i>	25
Figura 8. Escalado del cultivo autotrófico de <i>Coenochloris sp.</i>	28
Figura 9. Crecimiento de <i>Coenochloris sp.</i> con FSP al 5%	30
Figura 10. Eficiencia de métodos de extracción de carotenoides.	34
Figura 11. Tratamientos usados para la extracción de pigmentos.	35
Figura 12. Concentración de carotenoides totales vs tiempo en días.....	37
Figura 13. Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 10 días de cultivo	38
Figura 14. Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 13 días de cultivo	39
Figura 15. Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 18 días de cultivo.	41
Figura 16. Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 25 días de cultivo.	42
Figura 17. Regresiones lineales de CNFK (control)	44
Figura 18. Regresiones lineales de FSPGSC M.....	45
Figura 19. Regresiones lineales de FSPGSC CDA.....	46

Figura 20. Columna cromatográfica y separación de pigmentos	48
Figura 21. Efectividad de tratamientos para la separación de carotenoides	50
Figura 22. Cromatogramas obtenidos por HPLC para la identificación de carotenoides en muestras de <i>Coenochloris sp</i>	52

Resumen

El cultivo de microalgas toma importancia por su eficacia en su crecimiento y generación de metabolitos. Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos, que poseen una capacidad antioxidante y son indispensables en el organismo humano (FAO, 2002), (SEMPLADES, 2009). *Coenochloris sp.*, es una microalga clorofita, capaz de acumular pigmentos fotosintéticos en condiciones óptimas de crecimiento. La evaluación de la microalga para producir pigmentos es importante para clasificarla, como una especie alternativa que otorgue rendimientos en la producción de pigmentos. Esta investigación tuvo como objetivos separar y cuantificar pigmentos fotosintéticos (carotenoides) del cultivo de la microalga *Coenochloris sp.*, en condiciones mixotróficas. Se logró adaptar a la microalga en condiciones de laboratorio en un cultivo autotrófico con Nitrofoska foliar (3mL/L). La microalga se evaluó con tres cultivos diferentes, autotrófico (CNFK), mixotrófico (FSPGSC M) y cultivo discontinuo alimentado (FSPGSC CDA), donde se adicionó 2,5 mL/L de fracción soluble de papa germinada sin cáscara (FSPGSC) al 5%, cada cinco días a los tratamientos mixotróficos y cultivo discontinuo alimentado. El tiempo de evaluación de los cultivos fue de 29 días, donde CNFK otorgó la mayor concentración de carotenoides con 0,6936 µg/mL, seguido de FSPGSC M y FSPGSC CDA con 5,0056 µg/mL, y 4,1326 µg/mL respectivamente. El solvente más efectivo para la obtención de pigmentos fue el DMSO. La separación de carotenoides fue más eficiente por cromatografía en columna mostrando un 54% de eficiencia. Resultados obtenidos en HPLC no han reportado presencia de carotenoides en ninguna de las muestras ya que las muestras han sido altamente oxidadas.

Palabras clave: *Coenochloris sp.*, mixotrófico, fracción soluble de papa, carotenoides, cromatografía.

Abstract

Culture of microalgae has become important due to its growth efficacy and metabolite yield. Carotenoids are photosynthetic pigments that have an antioxidant capacity and are essential for the human organism (FAO, 2002), (SEMPLADES, 2009). *Coenochloris sp.*, is a chlorophyte microalga capable of accumulating photosynthetic pigments in optimal growth conditions. The assessment of the microalga to produce pigments is important to categorize it as an alternative species that provides output in the production of pigments. This research aimed to separate and quantify photosynthetic pigments (carotenoids) from the microalgae culture *Coenochloris sp.*, in mixotrophic conditions. It was feasible to adapt the microalga in laboratory conditions in an autotrophic culture with foliar nitrophoska (3mL/L). The microalga was assessed through three different cultures, autotrophic (CNFK), mixotrophic (FSPGSC M) and discontinuous fed culture (FSPGSC CDA), where 2,5 mL/L of soluble fraction of germinated peeled potato (FSPGSC) 5% were added to the mixotrophic treatments and the discontinuous fed culture. The length of the assessment was 29 days, where CNFK revealed the biggest concentration of carotenoids, followed by FSPGSC CDA and FSPGSC M showing 0,4853 nm, 0,4792 nm and 0,4681 respectively. The most effective solvent to get the pigments was the DMSO. The separation of carotenoids was more efficient by column chromatography displaying 54% of efficiency. The results obtained by HPLC have not shown presence of carotenoids in any sample as they have been highly oxidized.

Key words: *Coenochloris sp.*, mixotrophic, soluble fraction of potato, carotenoids, chromatography

Introducción

Las microalgas muestran varias ventajas en su proliferación dependiendo de la condición del cultivo, ya sea autotrofia, mixotrofia o heterotrofia, cultivos continuos o discontinuos (García D. , 1988), estos microorganismos tienen la capacidad de recurrir a diferentes sustratos orgánicos como fuente de carbono, energía, además de CO₂ y agua, que de cierta forma aumentan su reproducción o formación de compuestos (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993).

Sabiendo que los cultivos discontinuos alimentados producen una elevada cantidad de biomasa en comparación con otras condiciones, lo que seguramente es causado por el efecto energético de la luz y del sustrato orgánico que se le es añadido (Moronta, Mora, & Morales, 2006), las microalgas poseen un eminente contenido de metabolitos: pigmentos y proteínas obtenidos por la variabilidad en su comportamiento fisiológico, es decir, que su composición bioquímica puede modificarse variando las condiciones del cultivo como temperatura, luminosidad, fotoperiodo, pH, salinidad y edad del cultivo, entre otras (García D. , 1988).

Todos estos aspectos han sido de gran interés para la producción de compuestos de uso comercial, alimentario, agrícola, farmacológico, tomando en cuenta nuevos intereses a futuro (Fábregas, Morales, Arán, & Otero, 1998).

Desde hace ya varias décadas atrás se investiga la producción de pigmentos de origen natural, aislando, caracterizando y purificando muchos compuestos de este tipo (Durán, Teixeira, De Conti, & Espósito, 2002). Sin embargo las nuevas técnicas biotecnológicas, parecen ser una mejor alternativa para la obtención y producción de estos compuestos. Plantas, hongos filamentosos y en su mayoría microorganismos (microalgas), han traído consigo la generación de nuevas tecnologías y nuevos

pigmentos; así mismo, la creación de estos productos, puede suplir en gran parte el uso de colorantes químicos o sintéticos (Méndez, y otros, 2005).

Los pigmentos son sustancias químicas utilizadas en industrias alimenticias como aditivos, intensificadores de color y otros; en industrias farmacéuticas y en industrias textiles. Estos productos pueden ser separados por distintos métodos, el grado de pureza del pigmento asegura la eficacia del mismo en cualquier proceso. La función principal es dar color a otros materiales por el efecto óptico de la refracción de la luz del sol (Wani, Naphade, Chaudhari, & Chincholkar, 2004), es por eso que es importante evaluar el método más efectivo de separación.

Los carotenoides son metabolitos secundarios que se derivan de la producción de pigmentos fotosintéticos de las microalgas y que particularmente no solo son utilizados para dar color a otros elementos, sino que son considerados como uno de los primeros compuestos con capacidad antioxidante, junto con la vitamina E y C, que años después serían reemplazados por otros productos sintéticos con una capacidad antioxidante más uniforme, es por eso que separar de manera eficaz a los carotenoides es de suma relevancia (Pokorny, Yanishlieva, & Gordon, 2001).

Según la FAO (2002), los carotenoides pueden actuar como una provitamina. El carotenoide más significativo es el betacaroteno que puede convertirse en vitamina A por acción enzimática en la pared intestinal, siendo una fuente importante para los niños.

La escasez de vitamina A en nuestro organismo afecta con frecuencia el funcionamiento de los ojos y puede producir ceguera conocida como xeroftalmía. Se ha comprobado también afecciones en superficies epiteliales y se relaciona con un aumento en la ocurrencia de ciertos tipos de cáncer (ejemplo, cáncer de colon); es por eso que el gobierno ha implementado campañas de “Aliméntate Ecuador”, que se

concentran en rellenar el vacío que provoca una malnutrición en el país (Constitución de la República del Ecuador, 2008), (MIES, 2011), (SEMPADES, 2009).

Según el CODEX Alimentario (1995), en la norma para preparados dietéticos para regímenes muy hipocalóricos de adelgazamiento, marcan como esencial a la vitamina A, afirmando que las dietas muy hipocalóricas deberán suministrar el 100% de las ingestas diarias recomendadas de vitaminas y minerales, siendo para vitamina A 600µg.

Realizar una cuantificación de carotenoides es importante, ya que podemos comparar niveles de estas moléculas, a partir de varios microorganismos, hongos o plantas, con el fin de aprovechar al organismo más eficiente para su producción y también brindar un aporte científico para posteriores investigaciones. Los nuevos métodos, técnicas, materia prima que requiera el cultivo para minimizar costos y aumentar la eficiencia son aportes muy valiosos para los investigadores.

Tomando en cuenta la información e importancia se plantean los siguientes objetivos, separar pigmentos fotosintéticos (carotenoides) del cultivo de la microalga *Coenochloris sp.*, y cuantificar la producción de pigmentos fotosintéticos (carotenoides) en el cultivo de la microalga mencionada.

Para la presente investigación se formuló la siguiente pregunta: ¿la generación de carotenoides en *Coenochloris sp.*, se verá influenciada por la fracción soluble de papa (*Solanum phureja*)?, ¿Será el crecimiento celular un factor directo para la producción de carotenoides?.

Capítulo 1

Marco conceptual

1.1 Importancia de la microalgas

En los últimos años se han logrado avances importantes en la utilización de las microalgas para diversos fines como salud humana, cosmetología, purificación de aguas residuales, prevención de contaminación acuática, industria farmacéutica, acuicultura, producción de pigmentos y antibióticos, entre otros. Se han reportado aproximadamente 493 especies que podrían ser utilizadas como alternativas de alimentación para el hombre y otros animales (FAO, 1989).

En países como Alemania, Perú, India, Japón y México, han registrado que algunas especies de microalgas son un excelente complemento alimenticio para el hombre (Medina, Piña, Nieves, Arzola, & Guerrero, 2012).

1.2 Taxonomía y clasificación de microalgas

Las microalgas al tener un metabolismo semejante al de plantas se las toma en cuenta dentro del *Reino Plantae*, sin embargo, se encuentran características peculiares que comparten con otros microorganismos y otras que son únicas.

Forman parte del *Filo Chlorophytas*, o algas verdes, son un amplio grupo que se considera uno de los más evolucionado, presentando características particulares que las diferencian del resto de microalgas (Martínez, 2010), (Novelo, 2012).

1.2.1 Microalgas clorofitas

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de *Coenochloris sp.*

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Chlorophytas</i>
Clase	<i>Chlorophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Radiococcaceae</i>
Género	<i>Coenochloris</i>

Nota: Podemos ver que *Coenochloris sp.*, está dentro del *Filo Chlorophytas* guardando una gran similitud con varias especies vegetales que también son capaces de elaborar metabolitos primarios y secundarios. Tomado de Australian Antarctic Data Centre (Taxon Profile, 2015).

1.2.1.1 *Coenochloris sp.*

Esta microalga forma colonias de cuatro, ocho, 16 o más células planctónicas dentro de una estructura mucilaginosa y con un tamaño aproximado de 8 μm (Needham & Needham, 1978).

1.2.2 Composición bioquímica de clorofitas

Los elementos indispensables para la vida con aquellos que forman parte de la composición bioquímica de todos los seres vivos cumpliendo funciones biológicas (Velásquez & Ordorica, 2016).

Tabla 2.

Composición bioquímica de una microalga *Chlorophyta*.

Componentes	Porcentaje
Pérdidas por desecación	7-8
Nitrógeno total	6-7
Proteína bruta	50-54
Proteína verdadera	32-40
Carbohidratos	12-18
Fibra cruda	8-10
Lípidos	10-20
Cenizas	8-9
Ácidos nucleicos totales	4-5

Nota: Las microalgas *Chlorophytas* participan en procesos purificadores de aguas, dependen del medio donde se desarrollan para que su composición bioquímica varíe. Adaptado de Becker (Biotechnology and Microbiology, 1994), por E. Rodríguez, (2016).

1.2.3 Reproducción de clorofitas

Se dividen por bipartición o se transforman en esporas o gametos, debido a que sus células aisladas contienen un plasto parietal voluminoso provisto de un pirenoide. Cuando las células alcanzan su tamaño máximo en el interior se forman 4 a 8 células más pequeñas idénticas (autoesporas), que son liberadas por dehiscencia (apertura natural o espontánea de la pared de la célula madre) (Des Abbayes, y otros, 1989).

1.3 Cultivo mixotrófico

Todas las investigaciones dedicadas al cultivo de microalgas tienen una aplicación biotecnológica y comercial. Para lo cual se ha visto la necesidad de encontrar formas eficientes de cultivo que masifiquen la producción de compuestos a partir de estos microorganismos, pero que sean eficientes y de fácil manejo para determinar los parámetros que influyen en el desarrollo de las microalgas (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres, & Herrero, 1995).

Es trascendental indicar que el uso de medios de cultivo sintéticos ha incrementado en los últimos años, aumentando el valor económico para la producción de biomasa algal (González, Buitrago, & Frontado, 1999).

En los cultivos mixotróficos las reacciones fotosintéticas ocurren simultáneamente, ya que existe una asimilación oxidativa de compuestos orgánico y dióxido de carbono, por lo tanto existe una estimulación en la tasa de crecimiento de la microalga en comparación con otros tipos de cultivo (Lee, Lee, & Park, 1989).

La capacidad mixotrófica está influenciada por la intensidad luminosa, curva de crecimiento y ciclo de vida de la mayoría de microalgas principalmente en cultivos discontinuos, este tipo de cultivo reduce la demanda energética requerida por la biomasa obtenida, ya que no es indispensable la luz, como en el caso de *Haematococcus lacustris* (Barbera, Tomas, Moya, Ibañez, & Molins, 1993), con acetato y en *Scenedesmus falcatus* (Fingerhut, Groeneweg, & Soeder, 1990).

La producción de metabolitos de interés industrial, como carotenoides en *Chlorococcun sp.* (Carvajal, 2013), biotransformación de monoterpenos cíclicos y aldehídos aromáticos en *Euglena gracilis* (Noma & Asakawa, 1992), es aprovechada de forma más eficiente en cultivos mixotróficos. También la generación de biomasa rica en proteínas en *Chlorella saccharophila*, *Phaeodactylum tricornutum*,

Skeletonema costatum y *Pavlova lutheri*, en donde se usó como fuente orgánica de crecimiento productos de excreción de pollos y ganado vacuno y su eficiencia se dio en condiciones mixotróficas (Paniagua, Farfan, & Buckle, 1987).

Es así que estudios basados en bioenergética del crecimiento de microalgas revela que las mayores productividades de pigmentos se obtienen bajo condiciones mixotróficas (Lee & Erickson, 1987). Morales (1996), en su investigación con productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas, refleja una mejor producción de pigmentos y biomasa en cultivos mixotróficos.

1.3.1 Uso de fotobiorreactores

En los cultivos de microalgas no solo se genera biomasa para su aprovechamiento, también se ha incrementado la producción de compuestos químicos “finos”. Las microalgas han sido reconocidas como compuestos de alto valor agregado como: vitaminas, ficobiliproteínas, pigmentos, ácidos grasos esenciales y otros. Varios de estos compuestos son todavía producidos comercialmente en sistemas en carrusel o en lagunas abiertas. Ejemplos de esto son la producción de ficobiliproteínas y biomasa de la cianobacteria *Spirulina*, en países como los Estados Unidos, India, China y Cuba, así como la producción de β -caroteno utilizando *Dunaliella* en Israel y Australia (Lorenz & Cysewski, 2000).

El empleo de fotobiorreactores modernos, contribuye la reducción del costo de producción de estos compuestos y hacen más competitiva su fabricación mediante la utilización de microalgas.

Técnicamente en los cultivos conocidos como “Batch”, no se añade ningún sustrato a la carga inicial, ni se retira ningún producto hasta el final del proceso; estos cultivos al ser sistemas cerrados optimizan procesos metabólicos, pero existen excepciones, ya

que algunos cultivos son sometidos a aireación. Las microalgas tienden a multiplicarse considerablemente hasta que alguno de los nutrientes se agota o algún metabolito se acumula alcanzando niveles tóxicos (Fernandes, 2009).

El resultado final de un cultivo discontinuo “Batch” es un aumento de la biomasa algal, debido al cambio constante de concentración de los nutrientes en el medio de cultivo a lo largo del tiempo (Fernandes, 2009).

1.4 Pigmentos

Es notable apreciar el color que poseen muchas microalgas, cada *Phylum* tiene su combinación particular de pigmentos. Las microalgas tienen dos grupos principales de pigmentos, clorofilas (a y b) y carotenoides que constituyen el 0,5 al 5% del peso seco de la célula (Dufossé, y otros, 2005).

1.4.1 Clorofilas

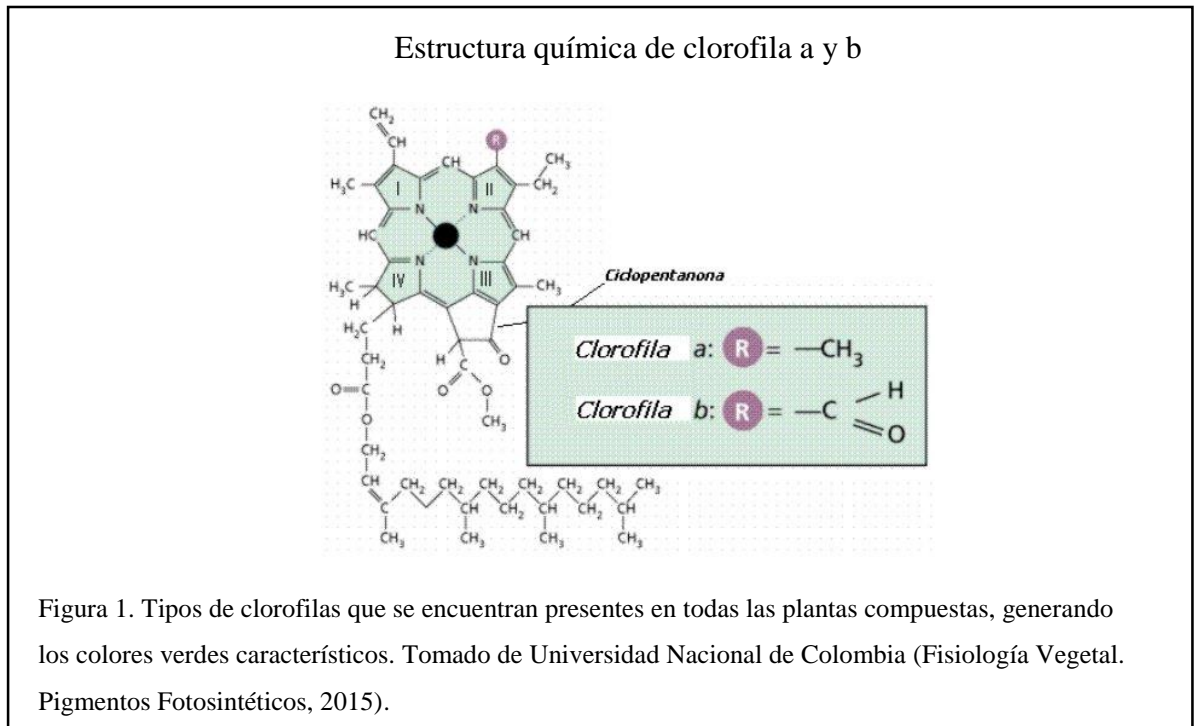
La clorofila ha destacado siendo el pigmento fotosintético primario de las microalgas. Otras *Chlorophytas* y *Euglenophytas* pueden tener clorofilas como la b, c, d y e (Gourvenia, Batista, Sousa, Raymundo, & Bandarra, 2008).

1.4.1.1 Tipos de clorofilas

Las clorofilas a y b son los dos principales pigmentos fotorreceptores, que se encuentran en las plantas.

La clorofila a y clorofila b pueden ser interconvertibles a través de la 7-hidroximetil-clorofila, por reacciones consecutivas de la clorofila b reductasa y la 7-hidroximetil-clorofilida reductasa. De esta manera la regulación del metabolismo de la 7-

hidroximetil-clorofila podría ser importante para el ajuste de las porciones de clorofila a y b. (Tanaka, y otros, 1998).



1.4.2 Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, son los responsables de colores amarillos, rojos y naranjas de alimentos tales como frutas, verduras, yemas de huevo, proporcionan el color característico del salmón y la trucha (Martínez, 2010).

También se les conoce como tetraterpenoides (C₄₀), siendo pigmentos con 40 átomos de carbono formados por ocho unidades de isopreno, donde la secuencia se encuentra invertida en el centro derivado de dos unidades de geranil – geranil – pirofosfato (Martínez, 2010), (López, Voltolina, Soto, & Figueroa, 2004).

Estructura de los principales carotenoides

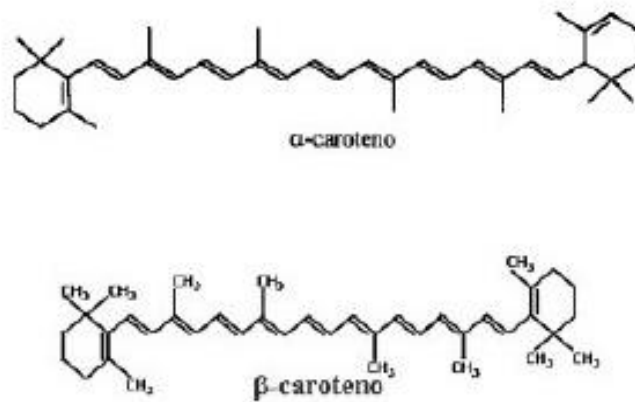


Figura 2. Carotenoides catalogados como los más abundantes en los alimentos, su aporte nutricional es importante en la dieta humana. Tomado de Srinivasan, Kkirt, Owen, & Fenema (Química de Alimentos

1.4.2.1 Tipos de carotenoides

Los carotenoides se clasifican en dos grupos: carotenos y xantofilas.

1.4.2.1.1 Carotenos

Los carotenos solo contienen carbono e hidrógeno (β -caroteno, licopeno, etc), correspondiente a la fórmula empírica $C_{40}H_{56}$ (Martínez, 2010).

Estructura química de algunos carotenos

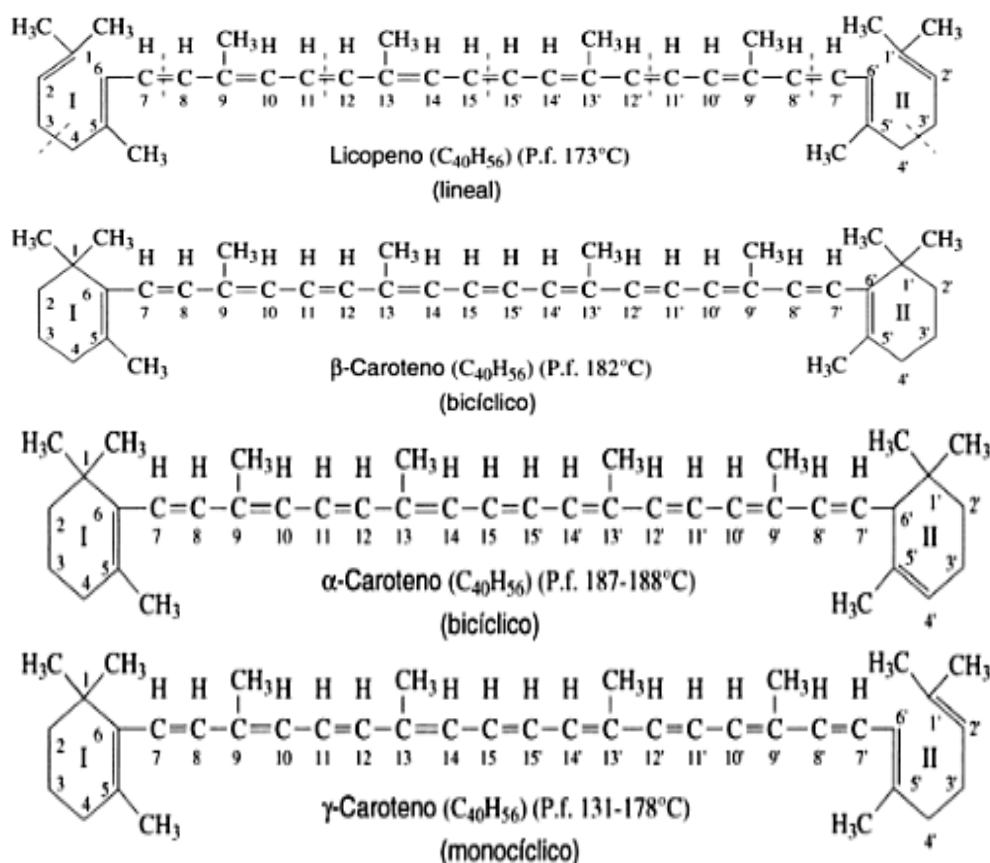


Figura 3. La variabilidad estructural confiere propiedades funcionales diferentes, estos cambios pueden ser tomando en cuenta el número y ubicación de dobles o triples enlaces (Boatella, 2004).

Tomado de Primo (Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria, 1995).

1.4.2.1.2 Xantófilas

Son derivados que en su composición tienen una o más funciones oxigenadas como (aldehído, ácido carboxílico, hidroxilo y otros), pueden ser acíclicos o contener un anillo de seis carbonos, cinco, a uno o ambos extremos de su estructura molecular (Martínez, 2010).

más abundantes en el 20,3% del total, seguida por la glicina y arginina. Lo que nos indica que se puede utilizar como fuente de carbono para cultivos con microalgas, pudiendo ser mixotróficos o heterotróficos (Wei, Zhang, Wei, & Chen, 2009).

1.5.2 Composición

Tabla 3.

Aporte nutricional de *Solanum phureja* L.

Agua	75,5%	Fósforo	54,0mg/100g
Proteína	0,7%	Hierro	0,60mg/100g
Grasa	0,1%	Riboflavina	0,06mg/100g
Carbohidratos	20,7%	Niacina	2,50mg/100g
Fibra	2,0%	Ácido ascórbico	15,0mg/100g
Cenizas	1,0%	Tiamina	0,08mg/100g
Calcio	7,00 mg/100g	Calorías	81,0

Nota: Tomado de Gómez (La papa, su comercialización y el caso especial frente a la comunidad de Pasquilla, 2008), por Rodríguez Emilia, (2016).

Tabla 4.

Análisis bromatológicos de los extractos solubles de papa (*Solanum phureja L.*).

	Extracto de papa <i>(Solanum phureja L)</i>
Cenizas %	-
Proteína %	0,10
Carbohidratos %	84,10
Fibra %	0,2
Grasa%	0,10
Energía %	233

Nota: Tomado de Cazco (Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto crudo de papa (*Solanum tuberosum*) en úlcera de estomago inducidas con etanol en ratas (*Rattus norvegicus*), 2011), por Rodríguez Emilia, (2016).

1.5.3 Uso y aplicación de fracción soluble de papa (FSP)

Es un preparado de papa, que sirve de suplemento para el medio de cultivo microalgal, principalmente es una fuente rica en carbono, se ha utilizado la papa (*Solanum phureja L*) por ser un material biológico fácil de obtener y de bajo costo.

Además trabajos realizados por Morales (1996) y Maldonado (2014), nos muestran que el valor energético de la papa es de dos a cuatro veces mayor que el maíz y otros cereales, la yuca, arroz, achira son usados como suplementos en cultivos de microalgas otorgando mayor efectividad.

Capítulo 2

Metodología

2.1 Diseño experimental

El diseño experimental a seguir cumple con cuatro etapas principales dentro del proyecto: cultivo de *Coenochloris sp.*, elaboración del medio de cultivo, extracción de carotenoides y análisis de carotenoides por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia).

2.1.1 Cultivo de *Coenochloris sp.*

Se inició con un inóculo del cultivo de *Coenochloris sp.*, que fue proveniente de una muestra de agua petrolizada del Municipio Simón Bolívar del estado de Zulia, Venezuela.

2.1.1.1 Identificación en microscopio óptico

Se aisló la cepa *Coenochloris sp.* de todo el consorcio que presentaba la muestra de agua petrolizada. Se tomó en cuenta tamaño, coloración, patrón de crecimiento, recomendado por Gao (1998), Sun y otros (2011), para su clasificación.

2.1.1.2 Recuento celular

Se utilizó una cámara de Neubauer en un microscopio óptico, según el Protocolo de microalgas (Tecnoplades. S.A, 2014), para poder determinar la cantidad precisa de la microalga en cel/mL y evaluar su cinética de crecimiento junto con posteriores escalamientos (cultivo autotrófico) y la manutención de la microalga.

Tabla 5.

Resumen de condiciones para escalamiento de la microalga en condiciones autotróficas.

Densidad celular 10 ⁶	Volumen (mL)	Condiciones				
		Aireación	Luz		Nitrofoska	# agitación al día
			Natural	Artificial		
1	20		x		x	1
3	250	x		x	x	2
7	1000	x		x	x	2
10	5000	x	x	x	x	3
20	20000	x	x	x	x	3

Nota: Los escalados se realizaron a partir de una cantidad específica de microalga, las condiciones fueron básicamente las mismas, tomando en cuenta que cultivos más grandes necesitaron de mayor cantidad de luz ya sea artificial o natural. Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

La tabla 5 muestra las condiciones que se tomaron en cuenta, siendo indispensables para el cultivo de *Coenochloris sp.* y su posterior escalado (Figura 5); los valores y condiciones fueron tomados en cuenta debido a la importancia que generan para un correcto crecimiento y desarrollo de la microalga, que incluye la adaptación a condiciones de laboratorio.

Resumen del escalado, sistema autotrófico de *Coenochloris sp.*

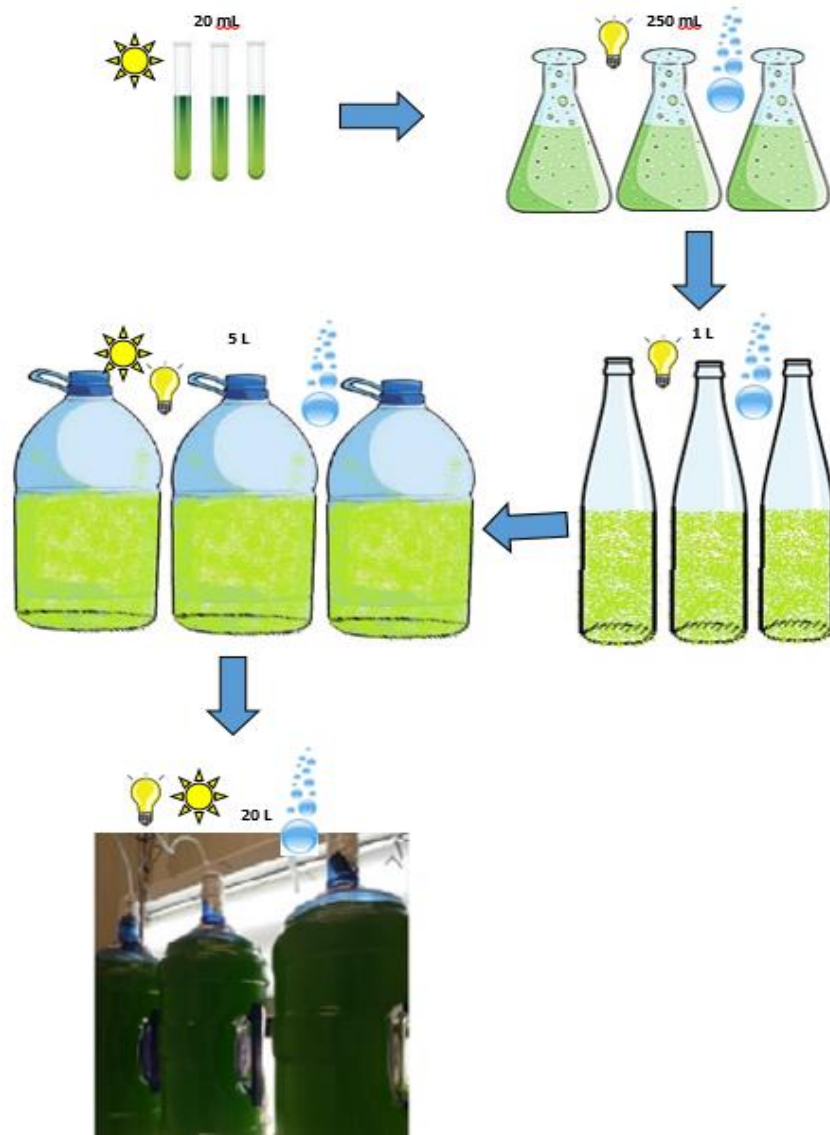


Figura 5. Escalado de *Coenochloris sp.* con solución Nitrofoska foliar en un sistema autotrófico.

Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

2.1.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado fue la FSP como suplemento en el medio de cultivo para el crecimiento de *Coenochloris sp.*, se seleccionó la especie de papa *Solanum phureja* L. conocida en Ecuador como papa chaucha, la figura 6 detalla los pasos seguidos.

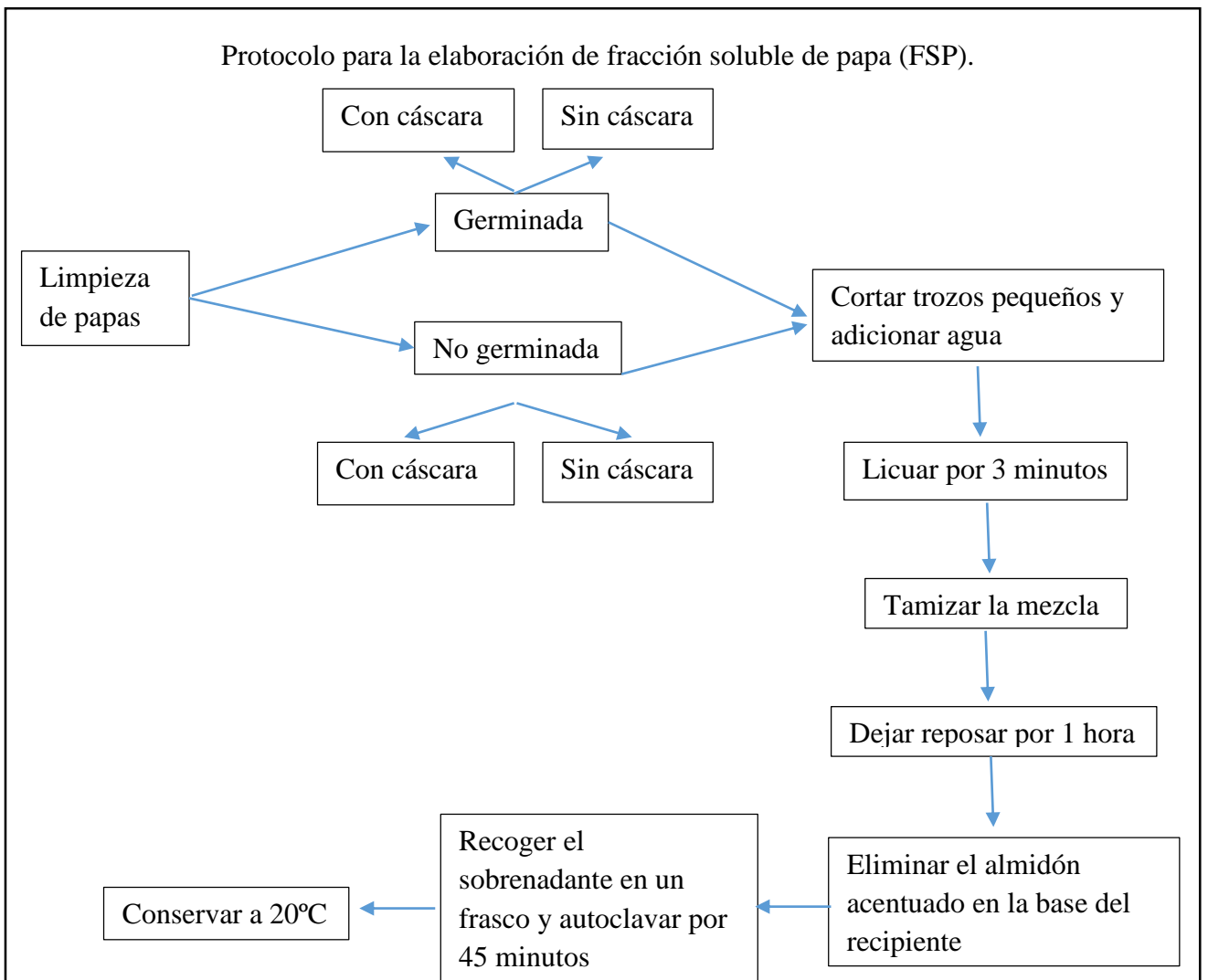


Figura 6. El protocolo de elaboración de fracción soluble consiste en eliminar sólidos que son los principales contaminantes del medio de cultivo microalgal. La importancia de eliminar el almidón depositado en el fondo del recipiente ayudó a prevenir posibles contaminaciones por bacterias que se alimentan del mismo ya que este se acumuló a manera de materia orgánica rechazado por el cultivo microalgal (Fábregas, y otros, 1996). Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

Tabla 6.

Resumen parámetros de elaboración FSP.

Concentración de FSP	Condiciones de papa				
		FSPNGCC	FSPNGSC	FSPGCC	FSPGSC
	FSP 5%	3 réplicas	3 réplicas	3 réplicas	3 réplicas
	FSP 10%				
FSP 20%					

Nota: Todos los parámetros resumidos en la tabla fueron necesarios para la elección del mejor tratamiento, el cual se usó en toda la investigación. Las siglas mencionadas en la tabla toman el nombre a fracción soluble de papa no germinada con cáscara (FSPNGCC), fracción soluble de papa no germinada sin cáscara (FSPNGSC), fracción soluble de papa germinada con cáscara (FSPGCC) y fracción soluble de papa germinada sin cáscara (FSPGSC) respectivamente. Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

Por último se realizó un escalado de la microalga *Coenochloris sp.*, en tres diferentes tratamientos por triplicado cada uno (cultivo autotrófico como control, cultivo mixotrófico, cultivo discontinuo alimentado) nombrados con las siglas CNFK, FSPGSC M, FSPGSC CDA respectivamente.

2.1.3 Carotenoides

En el cultivo de microalgas la generación de metabolitos secundarios se da en la fase estacionaria (Parés , Farrás, & Juárez , 1997), y para el aislamiento de carotenoides en los cultivos realizados se siguió el protocolo de García y otros (2012).

Se tomó alícuotas por triplicado en proporción (2:1) de acetona- metanol con 1 mL de la muestra de microalga, se agitó en vortex hasta lograr la mezcla de los componente y se dejó en refrigeración a 4°C por 48 horas (Fábregas , Morales, Polanco, Patiño, & Otero, 1996), se centrifugó cada muestra y se midió el volumen del sobrenadante e

inmediatamente se colocó en las celdas de vidrio para medir carotenoides a una longitud de onda determinada como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7.

Longitudes de onda definidas para la identificación de los principales compuestos fotosintéticos.

Pigmento	Longitud de onda (nm)
Clorofila a	663
Clorofila b	647
Carotenoides totales	480

Nota: Existen longitudes de onda mucho más específicas que en el caso de carotenoides pueden variar en un rango de 430-500, por ejemplo β -caroteno 478 nm y α -caroteno 473 nm (Davies, 1976). Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

Una vez comprobada la existencia de carotenoides en las muestras, se procedió a la extracción y aislamiento de carotenoides en los cultivos masificados, tomando en cuenta que habían llegado a su etapa estacionaria de crecimiento. Se suspendió todo el sistema de cultivo de la microalga y a todos los tratamientos (CNFK, FSPGSC M, FSPGSC CDA) se les dejó en reposo para que pasen por una decantación de 48-72 horas.

Se eliminó el sobrenadante y se recogió el residuo de cada tratamiento, posteriormente se extrajo carotenoides en donde se utilizó el compuesto dimetilsulfóxido (DMSO), por 48 horas, una vez transcurrido el tiempo se agitó en vortex y se centrifugó las muestras a 7000 rpm durante 15 minutos hasta la obtención de muestras concentradas de biomasa (Martínez, 2010), (Torres, Campostrini, Goncalves, & Yasmanishi, 2002), comunicación personal Morales (2014).

Se recogió el sobrenadante de cada muestra tratada, el sólido suspendido en el tubo se le añadió 5ml de DMSO repitiendo el proceso hasta la obtención de una extracción completa de carotenoides. Comunicación personal Morales (2014).

La separación de carotenoides puede llevarse a cabo por diferentes procedimientos, todo depende del tipo de muestra que tengamos, su procedencia y extracción.

Existen disolventes apolares en el cual los carotenos son solubles y el nivel de solubilidad dependerá de la estructura de la molécula de carotenoide. Los carotenos son muy solubles en éter de petróleo y hexano (García & Pérez, 2012).

Para el presente proyecto se utilizaron dos métodos de separación de carotenoides que se describen a continuación:

2.1.3.1 Cromatografía de columna en fase normal

Este método fue usado para el fraccionamiento y separación de clorofilas y carotenoides, para lo cual se utilizó el protocolo establecido por la Red Iberoamericana para el estudio de nuevos carotenoides bioactivos, como ingredientes de alimentos (2015), donde se detalla los materiales, reactivos, procedimiento y preparación de materiales de manera específica.

Una vez obtenidos los carotenoides se guardó en frascos color ámbar a -20°C y en oscuridad. (Red Iberoamericana para el estudio de nuevos carotenoides bioactivos como ingredientes de alimentos, 2015).

2.1.3.2 Saponificación

Se usó la metodología tomada por De Rosso & Mercadante (2007) y García y otros (2012), a las cuales se les hizo algunas modificaciones en cuanto al procesamiento de

la muestra, después de la saponificación, ésta fue concentrada y evaporada en un rotavapor y resuspendida en 1 mL de acetona.

También es importante saber que las muestras sometidas a saponificación, fueron muestras puras, obtenidas y aisladas del cultivo de la microalga *Coenochloris sp.*, a las que se saponificó (1 mL) en una solución 60% (p/v) de NaOH con metanol.

2.1.4 Análisis de carotenoides por HPLC

Todas las muestras obtenidas después del aislamiento y separación de carotenoides fueron en total 3 y cada una aforada a 1 mL de acetona: 1 muestra del CNFK, 1 muestra de FSPGSC M y 1 muestra de FSPGSC CDA.

Para el análisis en HPLC de cada muestra se hizo por triplicado tomando 20 µl para cada inyección. Las condiciones específicas del HPLC fueron tomadas de De Rosso & Mercadante (2007), con los siguientes cambios:

Tabla 8.

Condiciones específicas para el uso de HPLC

Tipo de columna	C18
Solvente. Fase isocrática	Metanol 100%
Tasa de flujo	1 mL/min
Temperatura	29°C
Longitud de onda	280 nm, 350 nm, 450 nm
Tiempo de retención	20 – 40 minutos

Nota: Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

El estándar usado fue β -caroteno marca SIGMA; las soluciones estándar fueron preparadas con las siguientes especificaciones:

Tabla 9. Condiciones para la preparación de soluciones estándar.

Concentración inicial	Variación de la concentración	Concentración final
10 mg	10 mg en 10 mL	100 ppm
0	0, 25, 50, 100, 200, 500	250 μ l, 500 μ l, 1000 μ l, 2000 μ l, 5000 μ l

Nota: Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

2.1.5 Análisis estadístico

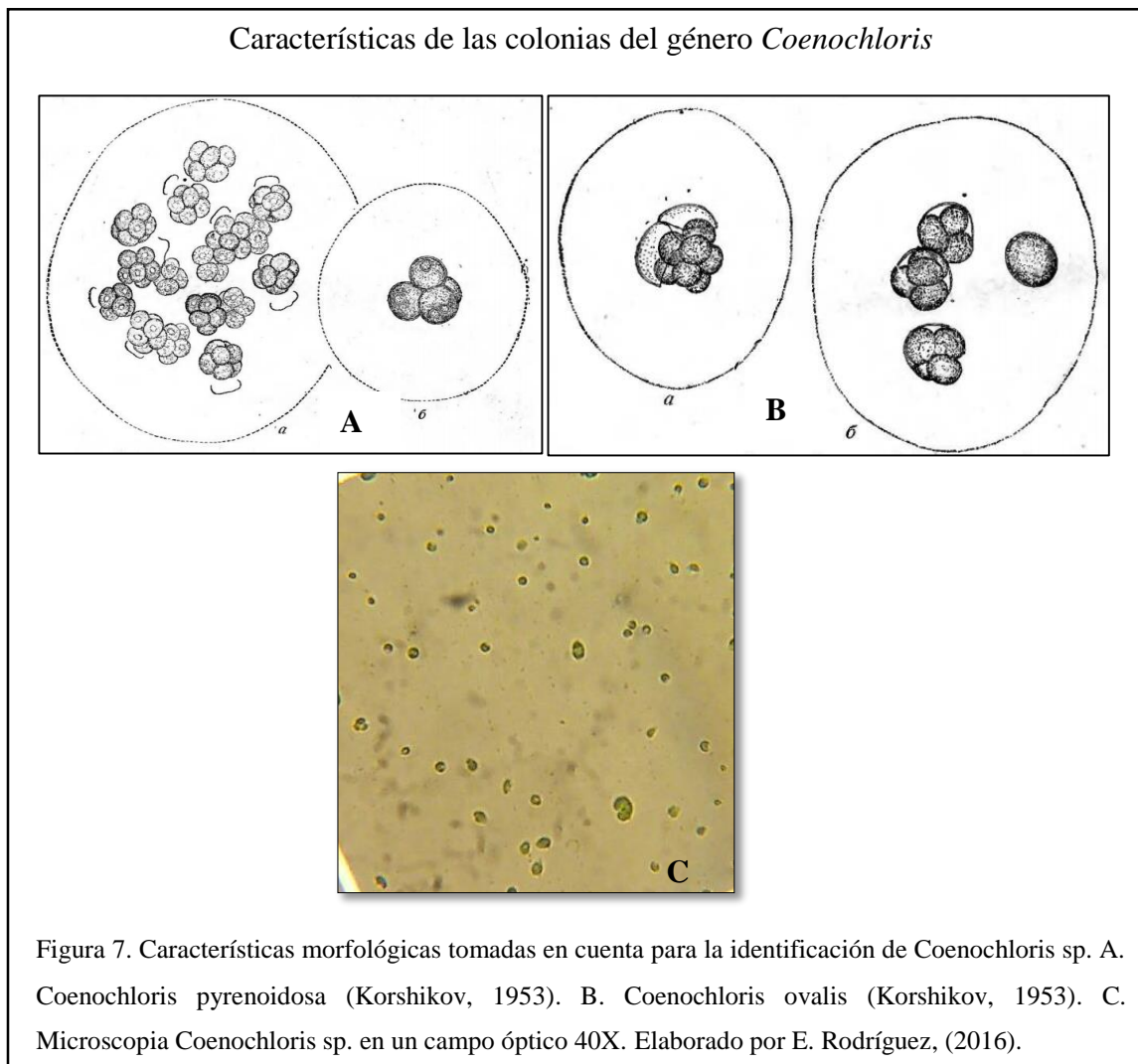
Se realizaron análisis de varianza y una prueba de Duncan para marcar diferencias estadísticas entre los tres tratamientos (CNFK, FSPGSC M y FSPGSC CDA) con tres réplicas cada uno en cuatro períodos de tiempo. Se utilizó el programa estadístico Infostat 2016.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1 Cultivo de *Coenochloris* sp.

Coenochloris sp. ha sido identificada por medio de microscopías (Figura 7), según el Manual de Korshikov (1953), donde se evidencian estructuras fisiológicas que caracterizan a la microalga dentro del género *Coenochloris*.



Los conteos en cámara Neubauer permitieron concentrar la muestra de microalgas para futuros escalamientos con distintos tratamientos, además, el recuento celular permite

observar las condiciones en que se encuentra el cultivo de microalgas. En las microscopias realizadas se han observado colonias con células esféricas de 2 a 9 μ , algunas con la presencia de células hijas en su interior, envoltura mucilaginosa y presencia de cloroplastos, (Figura 7).

Existen evidencias de *Coenochloris sp.*, donde además de las características observadas, se evidencian otras estructuras como presencia de colonias de hasta 100 células, presencia de 4 a 16 células hijas dentro de una célula madre (Korshikov, 1953). Así también se han encontrado evidencias de especies del género *Coenochloris* halladas en el embalse Paso de las Piedras que representan nuevas citas para este ambiente en Argentina, que por su forma y estructura se asemejan a las muestras del presente proyecto (Fernández & Parodi, 2005).

Sin embargo se toman en cuenta aspectos morfológicos como la permanencia de restos de las paredes celulares maternas dentro del mucílago colonial (Hindák, 1988), dichas estructuras no se han observado, además agrupa dentro del género *Coenochloris* a células alargadas (Wolf, Hepperle, & Krienitz, 2003), por lo que refutan nuestros resultados donde se pudo hallar células esféricas (Figura 7).

3.1.1 Escalado sistema autotrófico

La adaptabilidad de la microalga en condiciones de laboratorio se obtuvo a los 14 días del cultivo, de acuerdo a la curva de crecimiento (Figura 8). Podemos notar que la microalga tiene un crecimiento exponencial positivo en un periodo de 46 días.

El escalado de la microalga en un sistema autotrófico ha sido efectiva, generando la mayor tasa de crecimiento a los 39 días del cultivo con una masa celular de $42,49 \times 10^6$ cel/mL, correspondiente a la muestra 4 de la figura 8.

Los requerimientos nutricionales de microalgas varían dependiendo del objetivo a alcanzar, como masa celular rica en proteínas, generación de metabolitos o purificación de aguas. Las microalgas necesitan requerimientos físicos (luz, temperatura, pH, niveles de salinidad) y nutritivos (C, O, H, N, P, S, Na, K, Ca, Mg, Fe, vitaminas) para su correcto crecimiento, los valores de cada compuesto son aproximados, ya que, cada especie de microalga tiene requerimientos específicos, los valores también se ven influenciados por el sistema de cultivo aplicado y el medio de cultivo usado (agua de mar o agua dulce) (Acuña, 2011).

Escalado del cultivo autotrófico de *Coenochloris sp.*

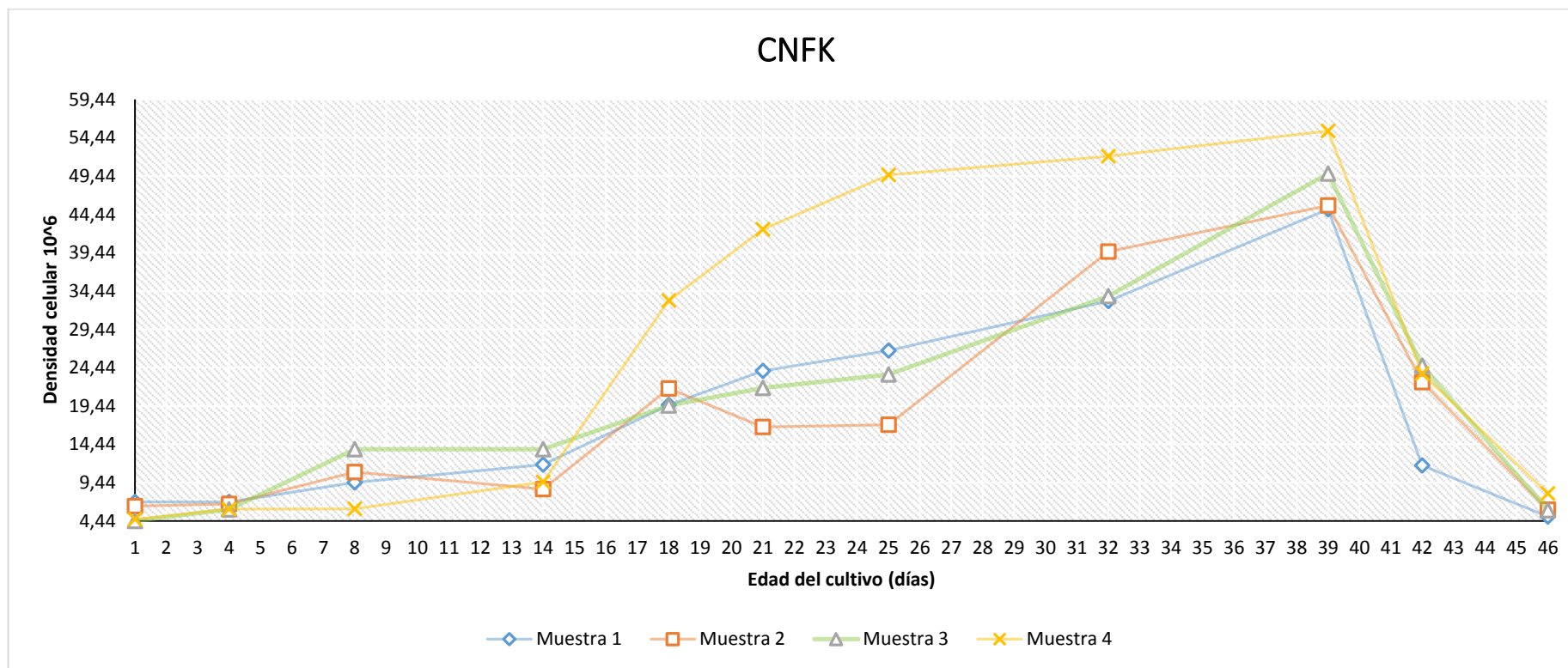


Figura 8. Curva de crecimiento del sistema autotrófico en *Coenochloris sp.*, utilizando Nitrofoska foliar. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

En comparación con el escalado en sistemas autotróficos, *Chlorococcum sp.* ha generado mejor rendimiento en su crecimiento con medio Nitrofoska ($8,41 \times 10^6$ cel/mL) (Carvajal, 2013), así como es el caso de cepas de *Chlorella*, *Haematococcus*, que pueden adoptar sistemas autotróficos, heterotróficos y mixotróficos con buenos rendimientos (Magazine, 2010).

La eficacia de cultivos autotróficos puede verse afectada con bajos niveles de nitrógeno y fósforo que reducen la densidad celular del cultivo (Kumar, Miao, & Wyatt, 2010), considerándose el cultivo autotrófico, menos eficiente que cultivos mixotróficos.

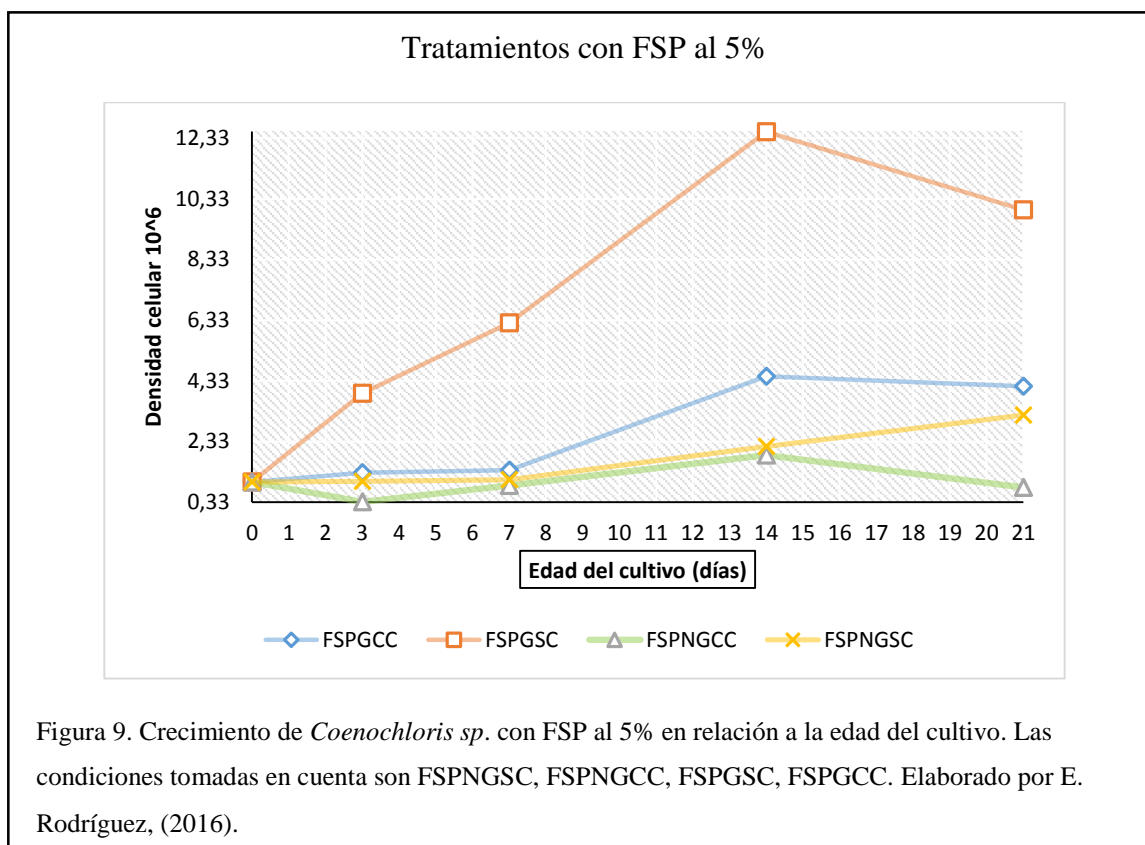
Según la FAO (1989), la presencia de luz natural o artificial aumenta el crecimiento de la microalga ya que al ser autótrofa necesita realizar reacciones de fotosíntesis indispensables para su metabolismo. Existen cultivos masivos en la intemperie, donde la luz natural es más penetrable por lo que resulta efectiva, además en cultivos a gran escala es recomendable la inyección de CO₂ (0.5%) para contribuir al proceso fotosintético.

3.2 Medio de cultivo

La especie *Solanum phureja L.* fue escogida como medio de cultivo para la microalga *Coenochloris sp.*, por su gran valor nutricional (Tabla 2), la facilidad en la que se encuentra en el territorio ecuatoriano, su precio es accesible para adquirir en grandes cantidades, además que es una de las principales fuentes de consumo humano en Ecuador.

Los tratamientos para evaluar el mejor crecimiento de *Coenochloris sp.*, con FSP se detallan en la figura 9, en donde la concentración ideal de fracción soluble de papa fue del 5%, tomando en cuenta la condición FSPGSC (fracción soluble de papa germinada

sin cascara), ya que generaron una mayor densidad celular al día 14 de $12,54 \times 10^6$ cel/mL en el cultivo de la microalga, con relación a las concentraciones de 10%, 20% y también a las otras condiciones a las que se le dio a la papa.



La menor concentración de FSP 5% fue tomada como ideal, ya que en cultivos de 10% y 20% existe una elevada presencia de bacterias y materia orgánica en el crecimiento de *Coenochloris sp.* Morales (1996), supone que la FSPGSC indujo la densidad celular más elevada de $84,7 \times 10^6$ cel mL⁻¹ con una diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a la papa no germinada y al control, resultados que concuerdan con esta investigación. Estudios realizados por Fábregas y otros (1996), aseguran que la FSP a bajas concentraciones induce a una densidad mayor, pero a concentraciones mayores del 30% se inhibe el crecimiento microalgal.

La FSP germinada genera un incremento en la concentración de nitrógeno y carbono soluble, nitrato, amonio, calcio y magnesio, pero disminuye la concentración de fosfato con respecto a la papa no germinada (Morales, 1996).

El proceso de germinación en la papa requiere un cambio bioquímico en su estructura, aumento de la síntesis proteica, aumento de giberelinas, citoquininas, auxinas, así como una inhibición de ácido abscísico (ABA) que actúa como inhibidor de crecimiento, (Fernández & Johnston, 2006), lo que hacen que el estado bioquímico cambie respecto al de un tubérculo no germinado y proporciona características nutricionales extras que favorecen la generación de carotenoides y otros metabolitos en cultivos microalgales.

Según Morales (1996), la cantidad de lípidos, carbohidratos y proteínas se encuentran en aumento en la FSP germinada con respecto a la FSP no germinada, así también la FSP germinada presenta una elevada concentración de aminoácidos libres y está enriquecida con glutamina, histidina, glicina, arginina, lo que indica que los aminoácidos libres presentes y amonio, constituyen las fuentes nitrogenadas más importantes de la FSP, dando la disponibilidad de ciertos nutrientes esenciales para la microalga o para las bacterias asociadas, los cuales pueden ser transformados para estimular el crecimiento celular y concentración de pigmentos.

El extracto crudo no autoclavado de FSP, contiene un incremento en la concentración de aniones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NO_3 , NO_2 , SO_4 , así como el contenido de carbono varía entre 193,6 (papa no germinada) y 324,2 mg at g l⁻¹ (papa germinada). Sin embargo el contenido de fosfato se reduce entre muestras de papa germinada y no germinada (Morales, 1996).

Cuando existe la suficiencia de nutrientes, el carbono fijado es fotosintéticamente mejor asimilado en proteínas, como consecuencia, la microalga posee una alta división celular (Myers, 1980).

Se considera más efectiva la FSP sin cáscara con respecto a la que tiene cáscara (Figura 9), ya que según Corral (2011), la mayor concentración de almidón y carbohidratos se encuentra específicamente en el tubérculo sin cáscara; la cáscara otorga a la papa fuente de potasio y fibra, que es aprovechada por bacterias y otros microorganismos que la descomponen.

La nutrición que le otorga la FSP al cultivo de la microalga se debe a la gran concentración de carbohidratos, lo que hace que la microalga aproveche este sustrato como fuente de carbono para poder realizar procesos fotosintéticos (Nambara & Marion Poll, 2005) y de esta manera entrar en la ruta de isoprenoides para la formación de carotenoides.

El 90% de los cultivos realizados en esta investigación se mantuvieron con aireación, ya que la carotenogénesis es un proceso aeróbico, siendo el aire un factor esencial para asimilar de manera eficiente los nutrientes proporcionados en los tratamientos (autotrófico, mixotrófico con FSP y discontinuo alimentado con FSP), proporcionando una mayor síntesis de carotenoides y crecimiento celular (Carvajal, 2013).

Sin embargo, existen factores que influyen en la formación de carotenoides en un cultivo de microalgas, los cuales pueden variar dependiendo la especie de microalga usada y el tipo de tratamiento al que es sometido (FAO, 1989).

La irradiación de luz blanca en algas puede ser un limitante para la producción de carotenoides, sin embargo se toma en cuenta intensidades luminosas para cada microorganismo, en *Haematococcus* la luz no es indispensable para la formación de

astaxantina y en *Chlorococcun wimmeri* es una necesidad para estimular la producción de carotenoides (Goodwin, 1980).

La temperatura es un factor importante en un cultivo de microalgas, ya que su aumento o disminución puede generar una activación o desactivación de proteínas y enzimas involucradas en el sistema fotosintético que permiten la formación de pigmentos (clorofilas y carotenoides). Dichas enzimas controlan los niveles de carotenoides producidos por microorganismos (FAO, 1989).

El aumento o disminución de salinidad en los cultivos microalgales pueden afectar potencialmente la acumulación de pigmentos. Los nutrientes añadidos a los cultivos pueden variar en concentración dependiendo el compuesto que deseemos obtener, es así que la fuente de nitrato puede aumentar la producción de carotenoides en algunos cultivos de microalgas, sin embargo puede verse afectada la tasa de crecimiento (Harker, Tsavalos, & Young, 1996).

Es de interés saber que el peróxido de hidrógeno en un cultivo de microalgas induce al estrés oxidativo, por lo tanto la producción de carotenoides aumenta significativamente como un sistema de fotoprotección frente a la oxidación que produce este compuesto (Harker, Tsavalos, & Young, 1996).

3.3 Extracción de carotenoides

Las muestras analizadas pasaron por dos protocolos de extracción, acetona-metanol (2:1), (45 mL) y DMSO (60 mL), en donde se obtuvo los mejores resultados con DMSO pero en un lapso de tiempo más largo (5 días), (Figura 10).

Eficiencia de métodos de extracción de carotenoides

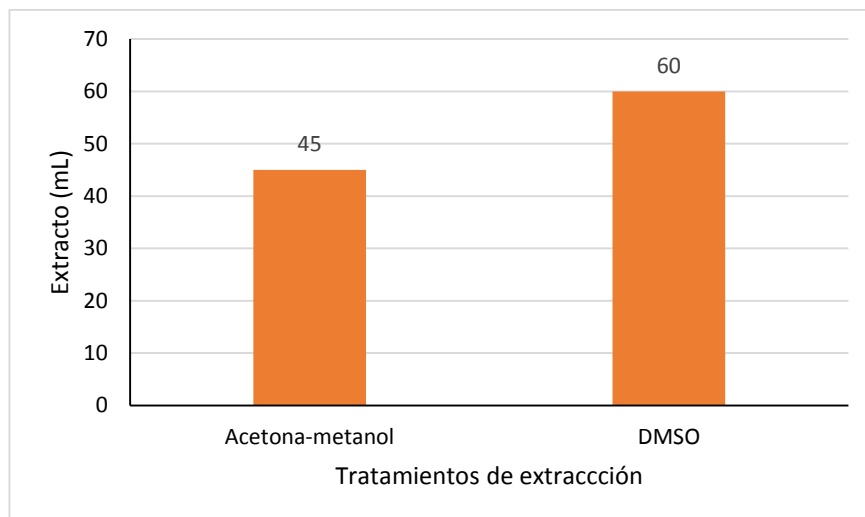


Figura 10. Los solventes usados para la extracción de carotenoides son varios pero los de mayor rendimiento son acetona y DMSO (Calatayud, Sanz, Barreno, & Del Valle Tascón, 1994). Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

El DMSO (dimetilsulfóxido) generó un mayor arrastre de pigmentos en las muestras tomadas del cultivo microalgal, aunque el tiempo en que las muestras reposaban con el compuesto era mayor, los resultados de extracción fueron los mejores, quedando como sedimento una sustancia blanquecina que nos hace suponer una total extracción de pigmentos (Figura 10), lo que no ocurría con el método de acetona-metanol.

Tratamientos usados para la extracción de pigmentos

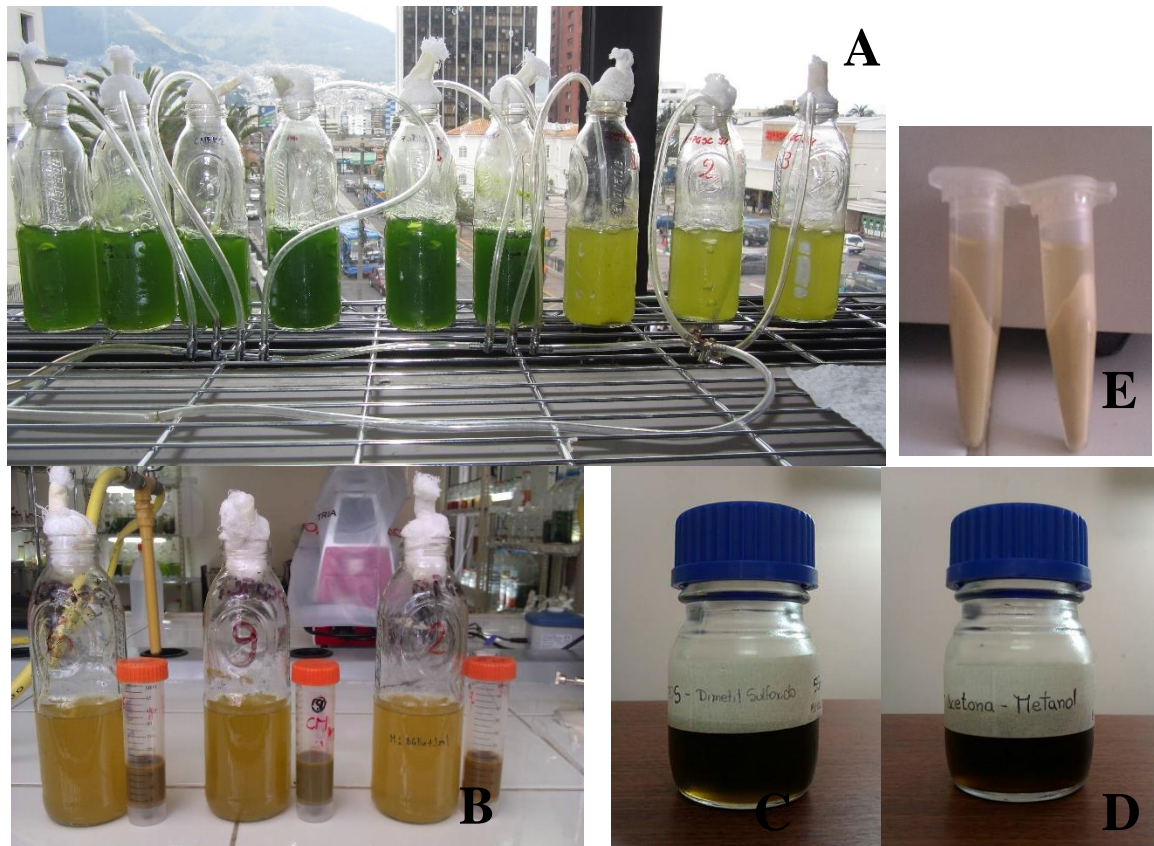


Figura 11. A. De izquierda a derecha, tres primeras botellas, cultivo autotrófico, cultivo discontinuo alimentado, cultivo mixotrófico. B. Cultivo mixotrófico extracción de pigmentos. C. Extracto de pigmentos con DMSO y D. acetona-metanol, siendo el color característico ámbar oscuro o amarillo intenso (color en cultivo), lo que daba a entender que la presencia de carotenoides era mayor que el de clorofilas. E. Sedimento blanquecino resultado de la extracción de pigmentos con DMSO. El grado de coloración de cada carenoide va a depender de la presencia de agentes oxidantes como O_2 y de que el cultivo proporcione la suficiente energía para que el proceso de formación tenga lugar (Meléndez, Vicario, & Heredia, 2004). Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

La acetona (80%) ha sido el solvente más utilizado para la extracción de clorofilas (Arnon, 1949), (Moss, 1967), debido a el cálculo de absorción de luz (Lichtenthaler, 1987). La extracción con acetona (80%) o acetona metanol (2:1), requiere triturar el material vegetal, agitar y posterior centrifugación. Este tipo de extracción puede dar

lugar a errores en la determinación de clorofilas (Moreth & Yentsch, 1970), por otro lado, la presencia de productos de degradación convierte en inestables estos extractos y principalmente carotenoides por la sensibilidad que presentan, Schoaf y otros (1976), demostraron que el solvente DMSO es más adecuado que la acetona en la extracción de pigmentos fotosintéticos en varias especies de algas. Sin embargo, los coeficientes de extinción de pigmentos en DMSO no han sido publicados (Ronen & Gallum, 1984). El DMSO es uno de los solventes más utilizados para la extracción de pigmentos fotosintéticos de tejidos vegetales y microalgas, la utilización de este solvente es debido a la estabilidad de los extractos y a su gran poder de extracción (Hiscox & Israelslam, 1979), (Ronen & Gallum, 1984).

3.4 Concentración de carotenoides totales

La mayor concentración de carotenoides se muestra en la figura 12 y pertenece al cultivo autotrófico con 5, 6936 $\mu\text{g/mL}$, seguido del cultivo mixotrófico con 5, 0056 $\mu\text{g/mL}$ y por último el cultivo discontinuo alimentado con 4,1326 $\mu\text{g/mL}$.

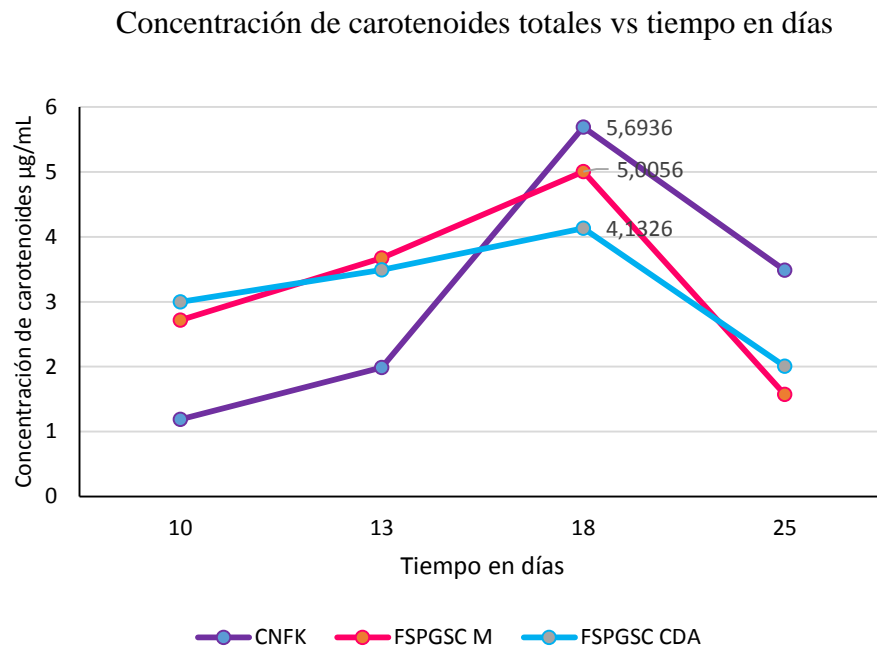


Figura 12. La ecuación propuesta por Strickland y otros (1972), determina la concentración de carotenoides totales en el cultivo de *Coenochloris sp.*, se basan en la absorbancia de los pigmentos activos lo que hace que no exista errores en la lectura. Sin embargo los resultados son muy variables, pero es apropiado para cultivos microalgales (Jeffrey & Humphrey, 1975). Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

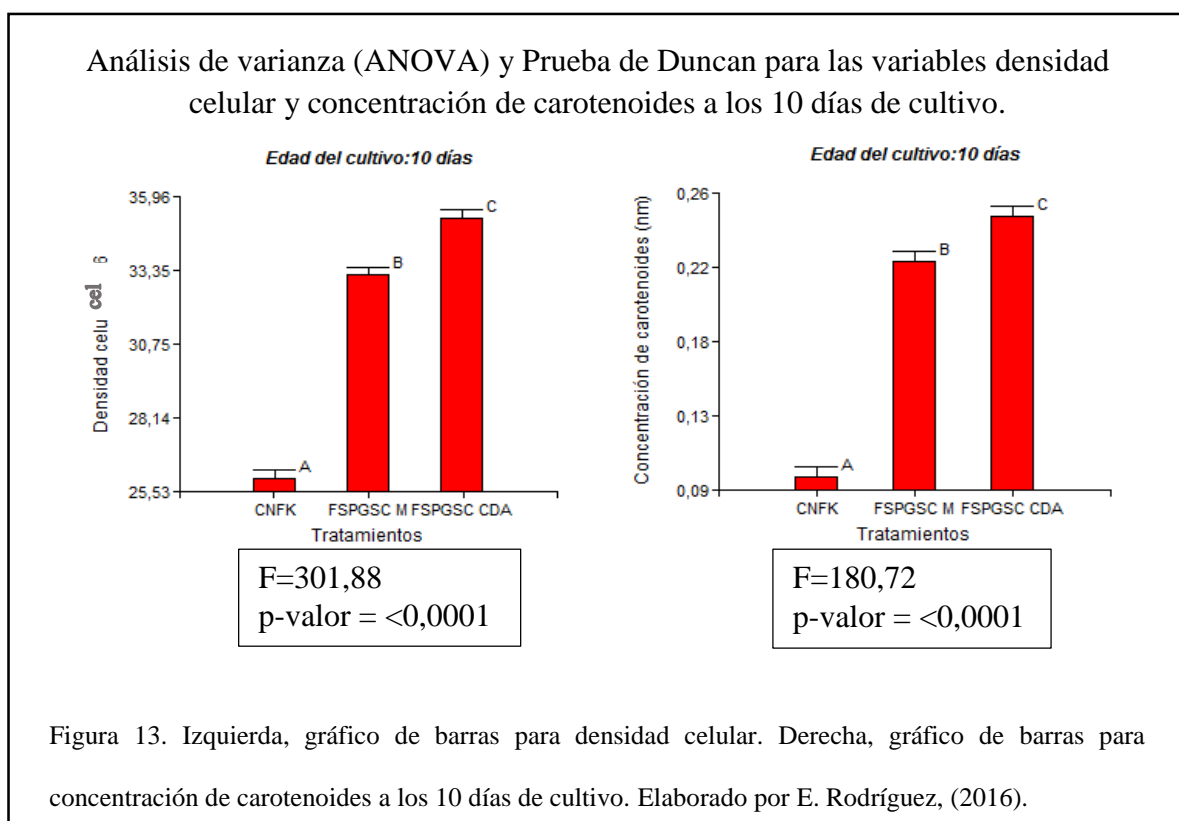
A pesar de la disponibilidad de nutrientes por fuentes orgánicas el cultivo mixotrófico y cultivo discontinuo alimentado, generaron menores concentraciones de carotenoides, su variación podría deberse a las condiciones físicas de los medios de cultivo, sin embargo el cultivo mixotrófico genera un alto rendimiento en cuanto a concentración de carotenoides, pero el tiempo de adaptación de la microalga para generar carotenoides es de 13 días, más corto respecto a los otros tratamientos.

En la figura 12 es evidente que el mejor tratamiento para generar carotenoides es el cultivo autotrófico, sin embargo, los cultivos mixotróficos son muy utilizados por generar la mayor cantidad de biomasa algal en cultivos de *Haematococcus lacustris* (Barbera, Moya, Sánchez, & Vilavella, 1996) y *Chlorella sp.*, (Vera, Yépez, Martínez,

& León de Pinto, 2002), en donde la digestión oxidativa de compuestos orgánicos y CO₂, pasan por un proceso de fotosíntesis donde se estimula el crecimiento de microalgas (Lee, Lee, & Park, 1989).

Los resultados generados por la prueba de Duncan y Análisis de varianza, se analizaron en 4 períodos de tiempo, entre los tres tratamientos, no solo para concentración de carotenoides, sino para la densidad celular.

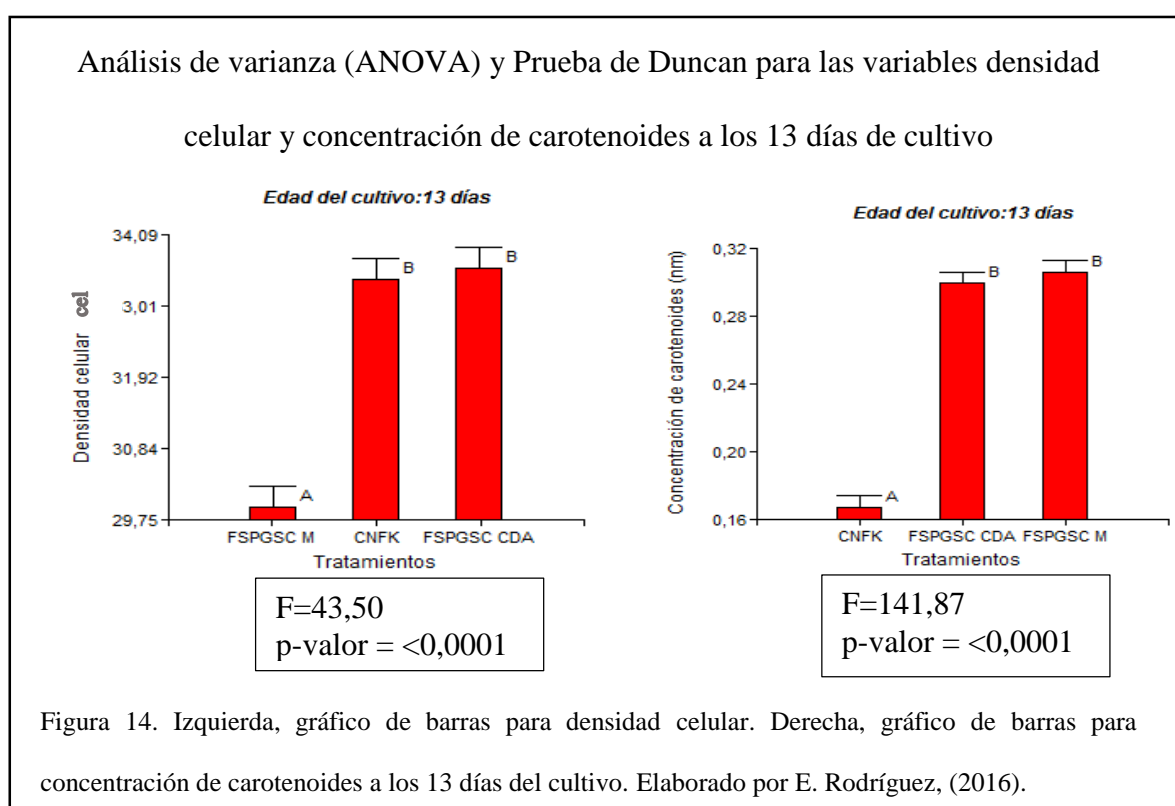
Los valores presentados en nanómetros son absorbancias comparadas a 480 nm, que es la longitud de onda a la cual los carotenoides se reflejan (Davies, 1976), mostrando la indirectamente la concentración de carotenoides.



Al tomar en cuenta períodos de tiempo, a los 10 días de cultivo podemos observar que la densidad celular y la concentración de carotenoides es proporcional, es decir, a mayor densidad celular, mayor concentración de carotenoides. En los dos casos el

valor de F y valor de p, nos muestran que existen diferencias significativas en cada tratamiento, clasificándolos en tres grupos totalmente diferentes (A, B y C).

El inicio del proceso experimental del cultivo con fracción soluble de papa, los tres primeros días se mantuvieron proporcionales, encontrándose en los cinco primeros días de adaptación, mientras que hasta el día 13 la fase exponencial se encuentra desarrollándose, manteniéndose los tres tratamientos similares donde existe el mayor aprovechamiento nutricional de la microalga.



Con respecto a los 13 días de cultivo los resultados han variado tanto en densidad celular como en concentración de carotenoides. El valor de F y de p en las dos variables en estudio nos refleja la existencia de diferencias significativas, en la gráfica de densidad celular existe una disminución muy significativa del cultivo FSPGSC M (cultivo mixotófico), mientras que el cultivo autotrófico tomado como control (CNFK)

muestra un aumento en su crecimiento. El cultivo discontinuo alimentado se mantiene constante.

El gráfico de concentración de carotenoides indica al cultivo autotrófico con un decrecimiento notable de carotenoides, a pesar de que existe un aumento en su densidad celular, mientras que en el cultivo mixotrófico hay un aumento de carotenoides a menor concentración celular. El cultivo discontinuo alimentado se mantiene constante, tanto en densidad celular como en concentración de carotenoides. A los 13 días el cultivo mixotrófico se ve muy afectado bajando drásticamente su densidad celular, esto puede ser por las condiciones en el que este cultivo se encontraba, pudiendo existir una contaminación por bacterias, las cuales hicieron que decline totalmente la densidad celular, sin embargo también se considera el tipo de ambiente en que se mantenían los cultivos como luz, temperatura y pH (7-9), algún ligero cambio podría producir la muerte del cultivo microalgal (FAO, 1989).

En el caso del cultivo autotrófico con Nitrofoska Foliar, el aumento celular es muy pronunciado, de igual manera las condiciones tanto físicas como nutricionales pudieron influir en el resultado de este cultivo y considerando que el cultivo se haya mantenido puro, sin contaminantes que descompensen la nutrición del cultivo de *Coenochloris sp.*

La concentración de carotenoides para el cultivo mixotrófico, como el cultivo discontinuo alimentado, tiende a ser similar a pesar de que la densidad celular del cultivo mixotrófico se ve afectada. Esto nos da a entender que la densidad celular no tiene relación con la cantidad de carotenoides que produce y tomando al cultivo discontinuo alimentado como óptimo, ya que cada cinco días a este tratamiento se le añadió 12,5 mL de FSP y por lo cual los nutrientes participaron en la ruta carotenogénica.

Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 18 días de cultivo

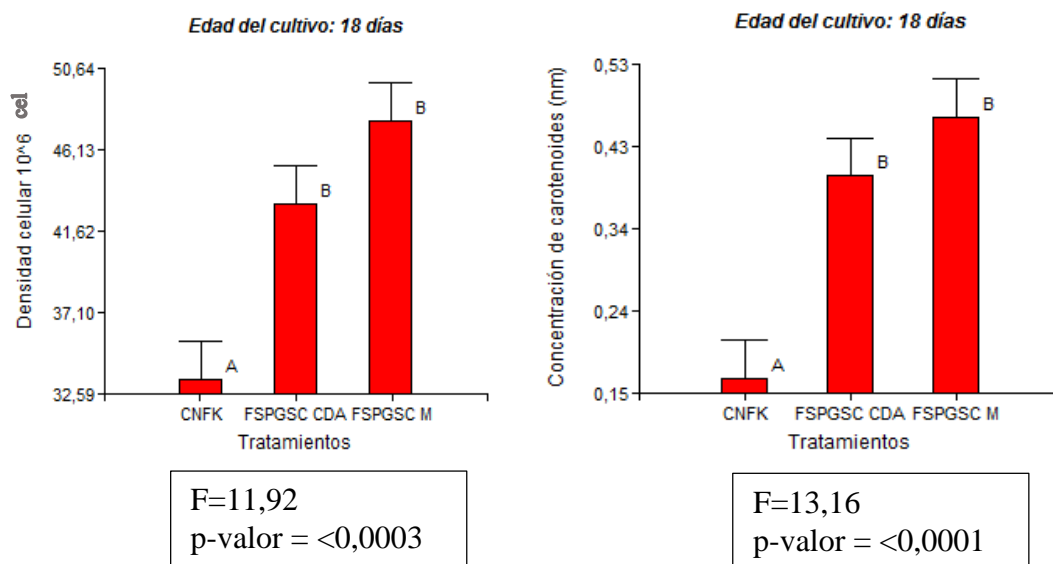


Figura 15. Izquierda, gráfico de barras para densidad celular. Derecha, gráfico de barras para concentración de carotenoides a los 18 días del cultivo. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

En el gráfico se puede observar un aumento celular en el cultivo mixotrófico y una disminución en el cultivo autotrófico, se consideran niveles de contaminación cruzada entre estos dos cultivos. Con respecto al cultivo discontinuo alimentado, la densidad celular disminuye, sin embargo la prueba de Duncan muestra que este cultivo junto con el cultivo mixotrófico son estadísticamente similares, descartando diferencias entre estos dos tratamientos.

En el análisis de varianza realizado con las dos variables podemos afirmar que existen diferencias significativas entre tratamientos tomando en cuenta el valor de F y p.

La concentración de carotenoides nos indica que en este período de tiempo se considera la fase estacionaria de los cultivos, en donde la densidad celular y la concentración de carotenoide guardan una relación directa.

Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Duncan para las variables densidad celular y concentración de carotenoides a los 25 días de cultivo

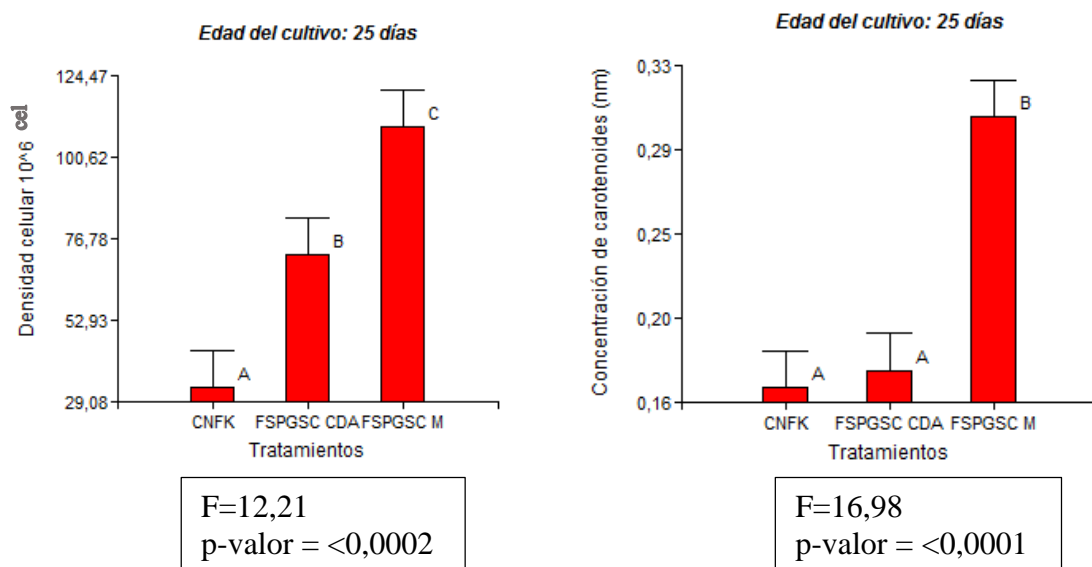


Figura 16. Izquierda, gráfico de barras para densidad celular. Derecha, gráfico de barras para concentración de carotenoides a los 25 días del cultivo. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

Para dar por finalizado los cultivos se hizo un control a los 25 días del cultivo, en donde se detuvo el funcionamiento de los fotobiorreactores para poder analizar densidad celular y concentración de carotenoides en el la fase estacionaria del crecimiento celular, suponiendo de esta manera que exista la mayor cantidad de carotenoides formados en los cultivos, independientemente de los tratamientos a los que han sido sometidos. En primer lugar ANOVA, tanto para densidad celular como para concentración de carotenoides se mantiene con una diferencia significativa, comparando valores de F y p.

Duncan nos muestra que los tres tratamientos estudiados, cada uno marca una diferencia de densidad celular muy definida, siendo el cultivo mixotrófico el más

recomendado para el crecimiento celular a los 25 días de cultivo, seguido por el cultivo discontinuo alimentado y por último al cultivo autotrófico (control).

Así mismo, el cultivo mixotrófico reflejó una mayor producción de carotenoides a mayor densidad celular, es decir, su relación es proporcional a los 25 días del cultivo, pero el cultivo autotrófico y discontinuo mostraron la menor concentración de carotenoides a los 25 días del cultivo. Esto podría deberse a la fotosensibilidad de los carotenoides, en la toma de muestras los carotenoides fueron degradados, lo que nos da a entender que en el proceso de formación de carotenoides, pudo haberse formado tipos de carotenoides mucho más sensibles a la luz u otro factor externo, mientras que en el cultivo mixotrófico existe la formación de carotenoides más resistentes a la degradación (Meléndez, Vicario, & Heredia, 2004).

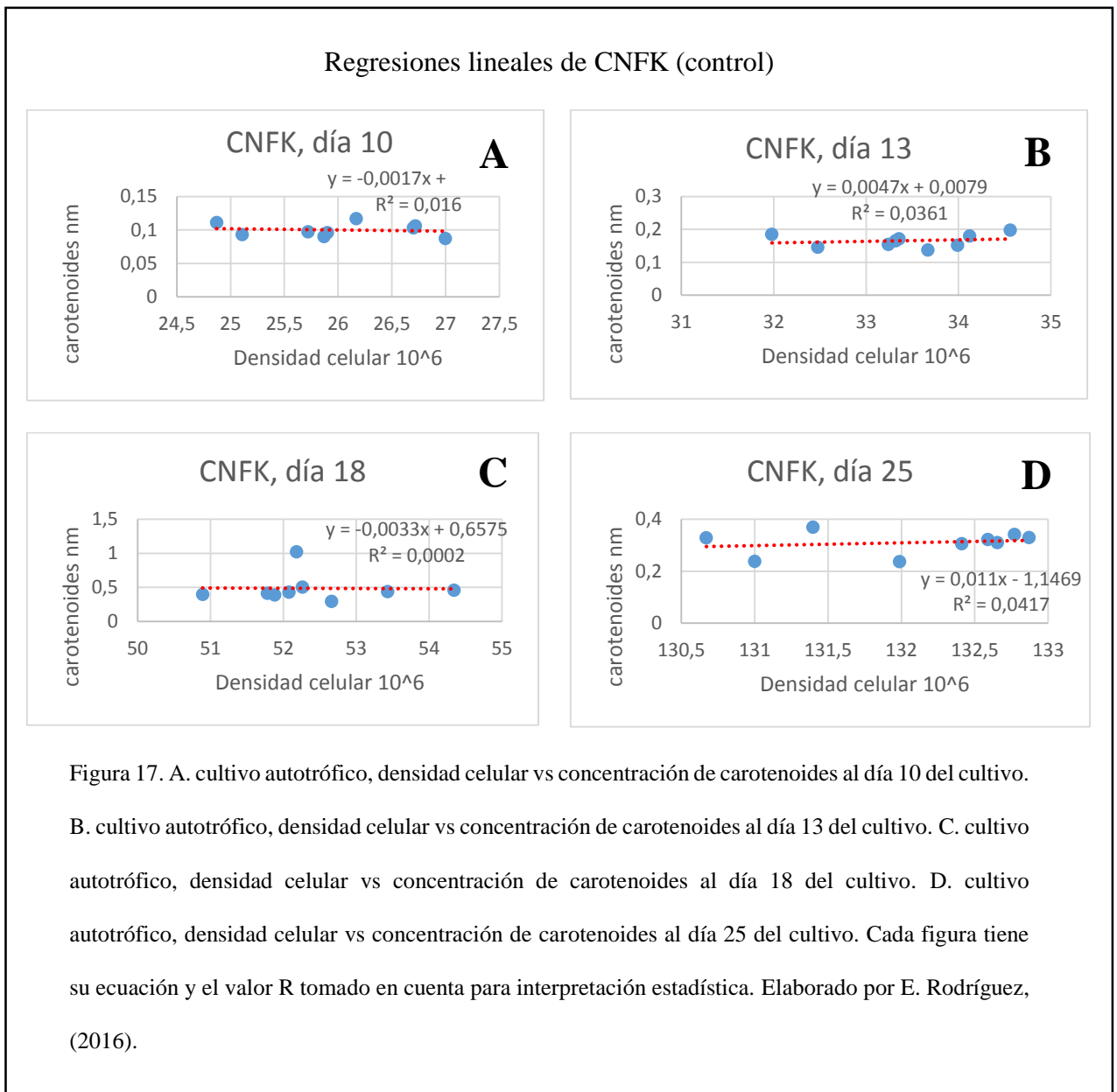
Además al ser un compuesto altamente sensible, la temperatura dentro del medio de cultivo es diferente al de la muestra tomada para análisis, por lo cual esta sería otra posible causa de degradación. Meléndez y otros (2004), conjugan variables como oxígeno y temperatura en la degradación del licopeno, siendo los principales causantes de degradación de carotenoides.

Para Meléndez y otros (2004), la alta degradación de carotenoides se debe a que son compuestos altamente insaturados, que se degradan principalmente por procesos oxidativos, los factores físicos que dan inestabilidad a los carotenoides generan reacciones de isomerización, afectando la manutención de los mismos.

Para poder comprobar si existe relación directa entre densidad celular y concentración de carotenoides, se hizo regresiones lineales con cada tratamiento en los cuatro períodos de tiempo.

Las figuras 17, 18, 19 representan específicamente las regresiones lineales de cada tratamiento por cada periodo de tiempo, en donde es visible que todos los resultados

generados coinciden con la no existencia de relación entre las dos variables, densidad celular y concentración de carotenoides.



Regresiones lineales de FSPGSC M

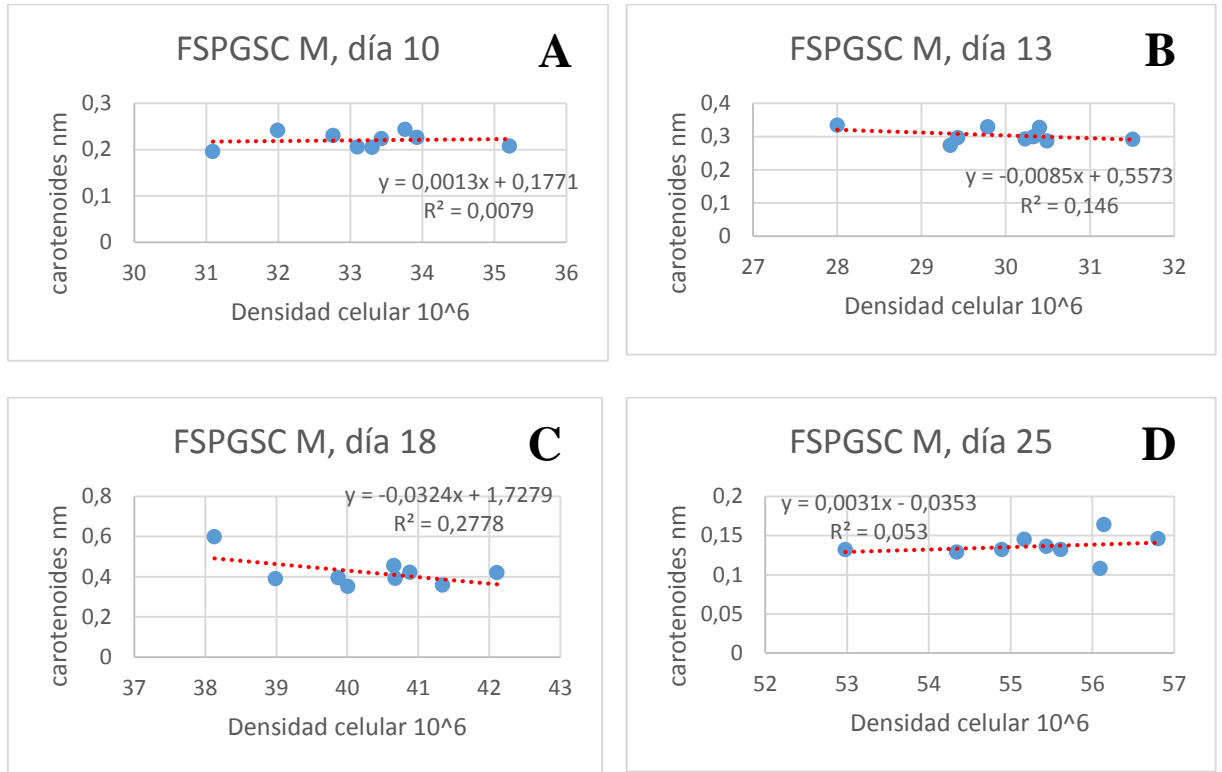


Figura 18. A. cultivo mixotrófico, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 10 del cultivo. B. cultivo mixotrófico, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 13 del cultivo. C. cultivo mixotrófico, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 18 del cultivo. D. cultivo mixotrófico, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 25 del cultivo. Cada figura tiene su ecuación y el valor R tomado en cuenta para interpretación estadística. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

Regresiones lineales de FSPGSC CDA

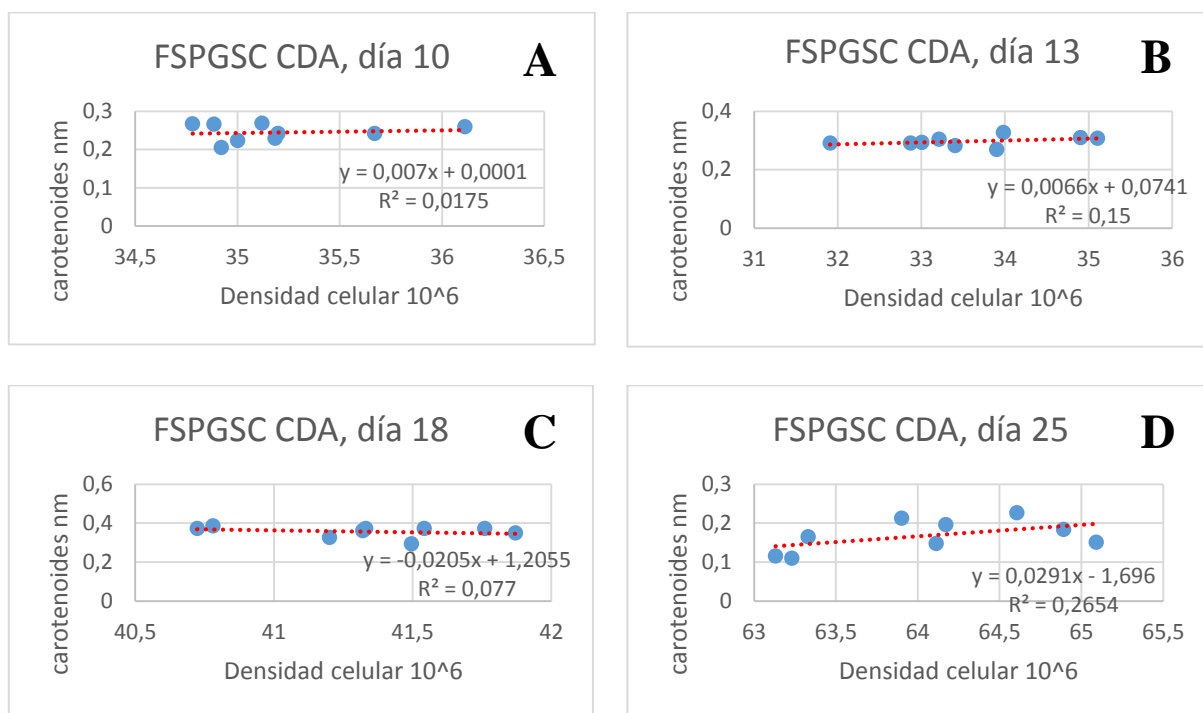


Figura 19. A. cultivo discontinuo alimentado, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 10 del cultivo. B. cultivo discontinuo alimentado, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 13 del cultivo. C. cultivo discontinuo alimentado, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 18 del cultivo. D. cultivo discontinuo alimentado, densidad celular vs concentración de carotenoides al día 25 del cultivo. Cada figura tiene su ecuación y el valor R tomado en cuenta para interpretación estadística. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

Tabla 10.

Valores R. Regresiones lineales

Tratamientos	Valor de R			
	Día 10	Día 13	Día 18	Día 25
CNFK	-0,12	0,60	-0,014	0,20
FSPGSC M	0,08	-0,38	-0,52	0,23
FSPGSC CDA	0,13	0,38	-0,27	0,51

Nota: Los valores de R ayudan a encontrar relaciones positivas o negativas entre dos variables, el valor más cercano a cero, significa que las variables en estudio no poseen ninguna relación (Vila, Sedano, & López, 2003). Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

Los valores de R para el tratamiento autotrófico, tomado como control (CNFK) resultan tanto negativos como positivos, cercanos a cero, afirmando que entre la densidad celular y concentración de carotenoides no existe ninguna relación. El día 13 con un $R=0,60$ posee una relación medianamente positiva, indicando que a esta edad del cultivo la relación entre las dos variables es directamente proporcional.

Para el cultivo mixotrófico y el cultivo discontinuo alimentado los valores de R, también reflejan que no hay relación entre las dos variables estudiadas, obteniendo valores muy próximos a cero.

Al considerar estos criterios estadísticos podemos asegurar que no existe ninguna relación entre densidad celular y concentración de carotenoides en ninguno de los tratamientos con microalgas.

3.5 Separación de carotenoides

Los resultados obtenidos por cromatografía (Figura 20), separa a los pigmentos dependiendo de los colores que se formaron en la columna, dichos datos se obtuvieron de Mancilla y otros (2012), los cuales concuerdan con la (Tabla 11).

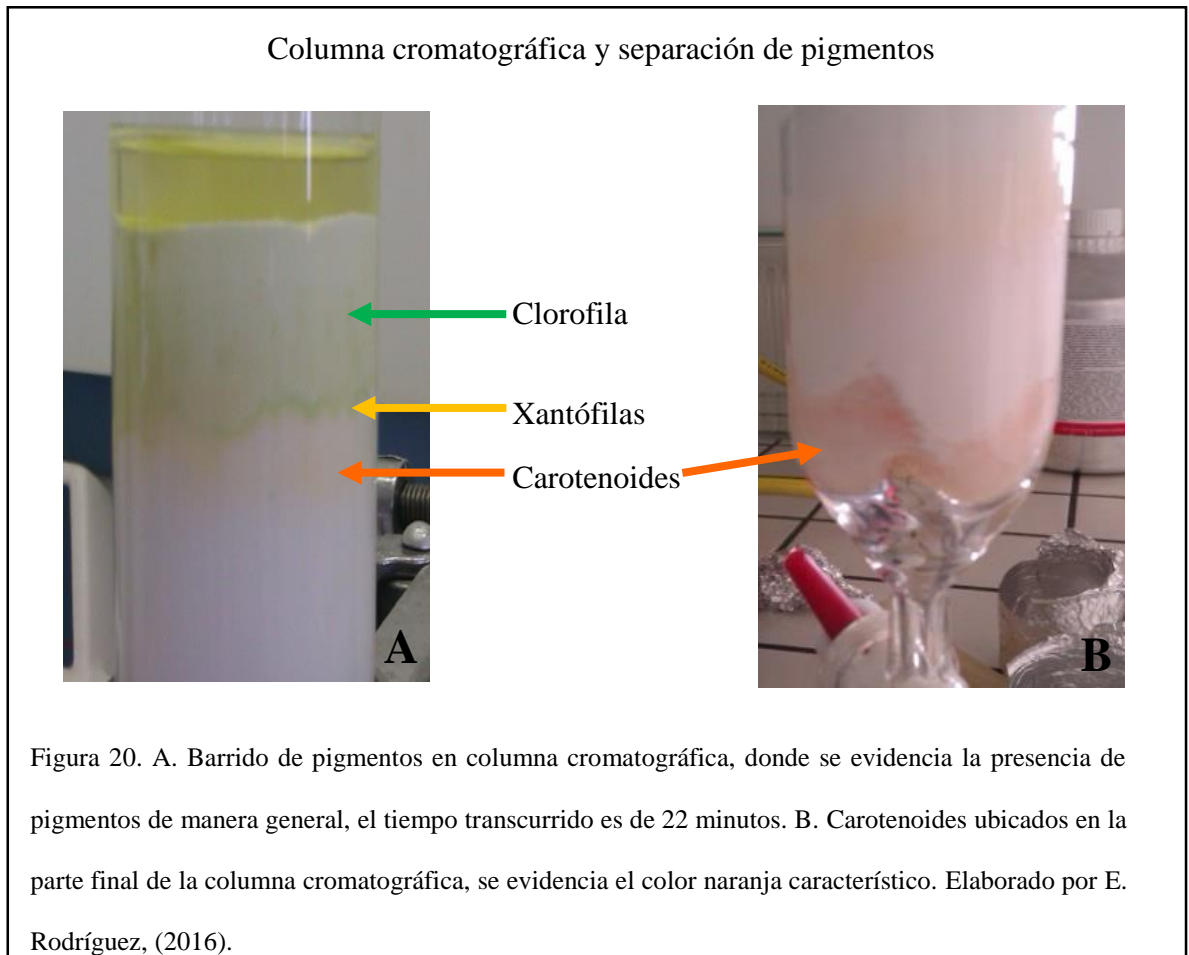


Tabla 11.

Colores de principales pigmentos fotosintéticos

Pigmentos/colores	Mezcla
Clorofila a (verde claro)	Benceno
	Acetona
	Éter de petróleo
Clorofila b (verde oscuro)	Benceno
	Acetona
	Éter de petróleo
Carotenos (naranja)	Benceno
	Acetona
	Éter de petróleo
Xantófilas (amarillo)	Benceno
	Acetona
	Éter de petróleo

Nota: Los pigmentos fotosintéticos se identifican en columna por un color específico, los solventes utilizados para cada pigmento se especifican en la tabla. Elaborado por Rodríguez Emilia, (2016).

En la comparación de los dos métodos de separación de carotenoides: cromatografía fina y saponificación (Figura 21), en donde el mejor método fue cromatografía con un 54% de efectividad comparado con el de saponificación, donde se obtuvo el 46% de efectividad.

Efectividad de tratamientos para la separación de carotenoides

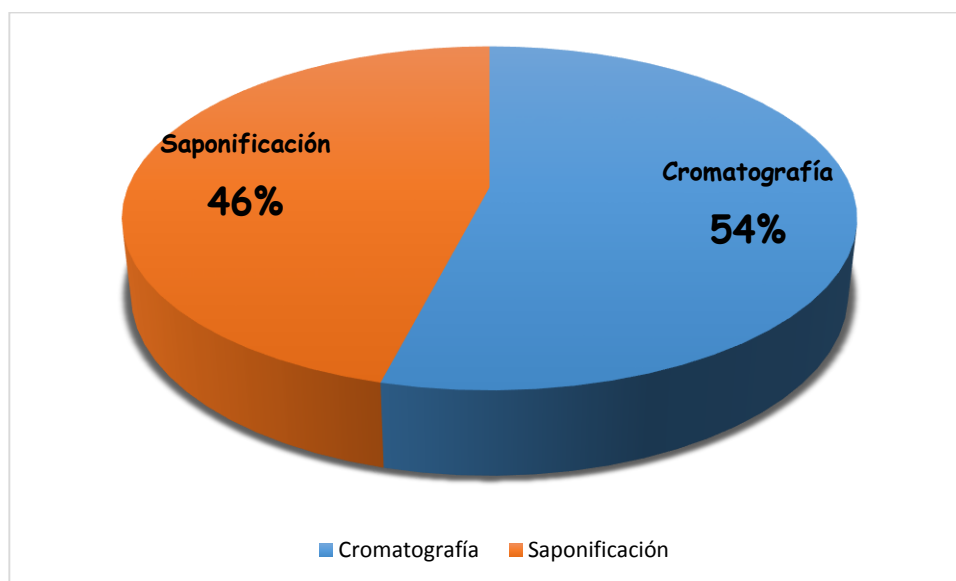


Figura 21. Para medir que método es más efectivo se tomaron en cuenta la cantidad en (mL) y la concentración de la muestra. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

El tiempo total para la obtención de carotenoides fue entre 100 y 120 minutos por cromatografía, mientras que en la saponificación el tiempo de espera fue de 24 horas.

La eficiencia de métodos de separación de pigmentos se dan principalmente por errores como: extracción incompleta, pérdidas de saponificación, separación cromatográfica incompleta, identificación errónea, isomerización y oxidación. La mezcla de los métodos, saponificación y cromatografía se consideran más eficientes para separar carotenoides, considerando el mejor solvente como separador (Rodríguez D. , 1997).

También, se considera la saponificación como el mejor método para remover las clorofilas y lípidos no deseados e hidrolizar ésteres de carotenoides. Sin embargo, también puede degradar carotenoides, todo depende de las condiciones en las que se use dicho método (Kimura, Rodríguez, & Godoy, 1990).

La exactitud y reproducibilidad de los resultados utilizando cromatografía, depende de la habilidad del analista en empacar la columna y en ajustar los volúmenes y proporciones de los solventes utilizados para la elución, así como también, la agudeza para visualizar la separación. (Rodríguez A. , 1997).

3.6 Análisis de carotenoides por HPLC

Cada muestra analizada no reportó ningún pico por lo cual no existe la presencia de carotenoides. El estándar usado presento una curva con el mayor pico a 450 nm de longitud de onda tal como se muestra en la figura 22.

Cromatogramas obtenidos por HPLC para la identificación de carotenoides en muestras de *Coenochloris sp.*

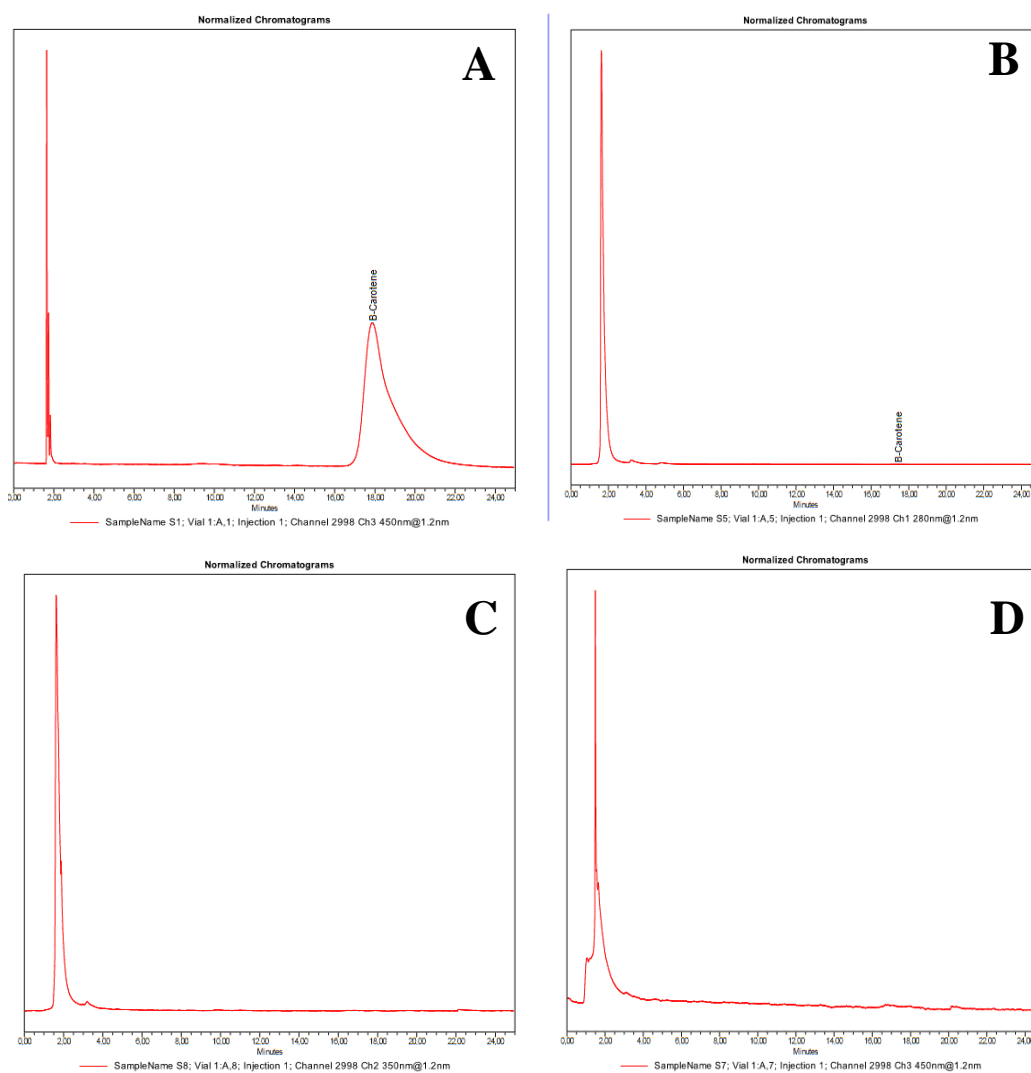


Figura 22. Cromatogramas obtenidos por análisis en HPLC para la detección de carotenoides en muestras microalgales. A. Solución estándar de β -caroteno, presencia del mayor pico a 450 nm de longitud de onda. Soluciones de muestras de microalgas B. CNFK a 280 nm, C. FSPGSC M a 350 nm y D. FSPGSC CDA a 450 nm, donde B, C, D la presencia de carotenoides es nula. Elaborado por E. Rodríguez, (2016).

La ausencia de carotenoides en las muestras podría deberse a procesos de oxidación causados por la temperatura, pH, luz, método de extracción donde no se tomó las medidas necesarias para la extracción de carotenoides, (Campo & Caporgno, 2006), la

luminosidad es un factor importante de degradación, estudios realizados en zanahoria, demuestran que existe una degradación de carotenoides del 5% en presencia de oscuridad, la cual sería causada por el oxígeno formando productos de oxidación en carotenoides de cadena corta, mientras que el 20% de la degradación de estos compuesto sería ocasionado por la luz, de tal manera que se ve afectada la actividad como provitamina A, también la columna usada no fue la específica para identificar carotenoides por medio de HPLC.

De Rosso y otros (2007), también recomiendan el uso de la columna C30, que es mucho más específica para identificar la presencia de carotenoides que la columna C18, sin embargo Rodríguez (1997), recomienda el análisis de HPLC con columna C18, en la cual las interacciones son suaves, por lo que la degradación de carotenoides podría ser más evidente.

La HPLC es considerado el mejor método para identificar diferentes compuestos, simples o compuestos, tiene un alto grado de resolución y reproducibilidad, pese a que las propiedades de las columnas varían significativamente de un fabricante a otro, así como de un análisis a otro el desempeño de la columna puede variar por una pequeña variación de la temperatura (Rodríguez A. , 1997). No obstante, a menudo las etapas precromatográficas pueden introducir errores significativos, los cuales no se pueden compensar en la etapa de la medición, no importa cuán sofisticado sea el instrumento analítico, los resultados obtenidos dependen de los solventes y la técnica usada (Rodríguez A. , 1997).

Los principales problemas en HPLC son obtener y mantener estándares de carotenoides para su cuantificación (Rodríguez A. , 1997), aunque los estándares usados en esta investigación no se han tomado en cuenta respecto a los resultados generados (Figura 22).

Conclusiones

La fracción soluble de papa (FSP), es una fuente de nutrientes completa para el cultivo microalgal, ya que aumenta la densidad celular y concentración de carotenoides, pero la relación densidad celular y concentración de carotenoides es nula, es decir, cada variable se desarrolla aprovechando los nutrientes presentes en el cultivo y las condiciones a las que es sometida de manera independiente.

La extracción inicial de pigmentos con DMSO (dimetilsulfóxido) resulta más efectiva que con acetona-metanol (2:1), extrayendo los pigmentos periódicamente cada 48 horas.

Procesos previos a la separación de carotenoides, concluyen que solventes como hexano y éter de petróleo son los mejores solventes para poder separar carotenoides y al tomar en cuenta el método de extracción ya que una mejor separación se dio por cromatografía en columna, con la distinción de diferentes pigmentos diferenciados por colores.

La cuantificación de carotenoides en las muestras de *Coenochloris sp.*, con diferentes tratamientos fueron negativas al analizarlas en HPLC, siendo las causas principales: métodos de extracción, condiciones ambientales físicas como luz y temperatura, isomerización y oxidación. Sin embargo se cuantificó carotenoides en espectrofotómetro, dando los mejores resultados con el tratamiento autotrófico, en menores proporciones cultivo mixotrófico y cultivo discontinuo alimentado.

Recomendaciones

La producción de carotenoides en *Coenochloris sp.*, puede ser probada utilizando otros suplementos nutricionales y variando las condiciones físicas con el fin de encontrar la mejores condiciones para potenciar la producción de carotenoides.

Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, c. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Coruña.
- Acuña, R. (2011). *Diseño de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas oleaginosas*.
- Arnon, D. (1949). *Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
- Australian Antarctic Data Centre. (2015). *Taxon Profile*. Obtenido de *Coenochloris sp*.
- Barbera, E., Moya, M., Sánchez, M., & Vilavella, A. (1996). *Contribución al estudio de la cinética de crecimiento de Haematococcus lacustris: I. Experiencias en presencia de DCMU*. España: Universidad de Valladolid.
- Barbera, E., Tomas, X., Moya, M., Ibañez, A., & Molins, M. (1993). *Significance tests in the study growth rate of Haematococcus lacustris: influence of carbon source and light intensity*. *J Ferment Bioeng*, 76, 403-405.
- Becker, E. (1994). *Biotechnology and Microbiology*.
- Boatella, J. (2004). *Química y bioquímica de los alimentos II*. Barcelona: Universitat Barcelona.
- Calatayud, M., Sanz, J., Barreno, E., & Del Valle Tascón, S. (1994). *Ventajas de la utilización del dimetilsulfóxido en la determinación de clorofilas y feofitinas en líquenes*. *Studia Botanica*, 13, 123-128.
- Campo, G., & Caporgno, P. (2006). *Degradación de vitamina A y carotenoides en zanahorias (Daucus carota) minimamente procesadas*. Obtenido de Universidad Técnica Nacional Villa María: http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2006/Archivos/TF07%20degradaci%C3%B3n%20de%20vitamina.pdf
- Carvajal, A. (2013). *Aislamiento y evaluación de la producción de carotenoides de la microalga Chlorococcum sp. en cultivo discontinuo con diferentes medios y fuentes de nitrato*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Casco, J. (2011). *Evaluación de la actividad gastroprotectora del extracto crudo de papa (Solanum tuberosum) en úlcera de estomago inducidas con etanol en ratas (Rattus norvegicus)*. Riobamba: Escuela Superior Politécnica e Chimborazo .

- CODEX STAN 203. (1995). *Norma para preparados dietéticos para regímenes muy hipocalóricos de adelgazamiento*. Recuperado el 08 de Junio de 2015, de file:///C:/Users/USUARIO/Downloads/CXS_203s%20(2).pdf
- Constitución de la República del Ecuador. (24 de Julio de 2008). República del Ecuador. *Asamblea Nacional*.
- Corral , G. (1 de Noviembre de 2011). *Valor nutritivo de la papa*. Recuperado el 29 de Febrero de 2016, de <http://www.potatoesusa-mx.com/downloads/PressReleases/Valor%20Nutritivo%20de%20la%20Papa.pdf>
- Davies, B. (1976). *Chemistry and biochemistry of plants pigments*. New York: T.W. Goodwin. Academic Press.
- De Rosso, V., & Mercadante, A. (2007). *Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 5062-5072.
- Des Abbayes, H., Gaussen, H., Chadefaud, M., Grassé, P., Feldmann, J., & Prévot, A. (1989). *BOTANICA vegetales inferiores*. Barcelona: Reverté.
- Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S., Blanc, P., Murthy, K., & Ravishankar, G. (2005). *Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality*. Trends in Food Science and Technology (16), 376-408.
- Durán, N., Teixeira, M., De Conti, R., & Espósito, E. (2002). *Ecological - Friendly Pigments From Fungi*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 42, 42(1).
- Fábregas , J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., & Otero, A. (1996). *Soluble fractions of Solanum tuberosum enhance cell and pigment production of semi-continuous cultures of the microalga Phaeodactylum tricorutum*. Letters in Applied Microbiology, 23, 223-226.
- Fábregas, J., Morales, E., Arán, J., & Otero, A. (1998). *Germinated Solanum tuberosum an agrivultursl product for marine microalgae culture*. Biores Technol, 66, 12-77.
- Fábregas, J., Morales, E., Polanco, N., Patiño, M., Otero, A., & Tobar, J. (1996). *Use of agricultural surpluses for production of biomass by microalgae*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 12, 47-49.
- FAO. (Abril de 1989). *Depósito de documentos de la FAO. La importancia de alimento vivo y su importancia en acuicultura una diagnosis*: Recuperado el 27 de Febrero de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/ab473s02.htm>

- FAO. (2002). *Departamento de agricultura*. Recuperado el 15 de Agosto de 2015, de <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s0j.htm>
- Fernandes, P. (2009). *Composición bioquímica y crecimiento de paralarvas de pulpo (Octopus vulgaris Cuvier, 1797), alimentadas con juveniles de Artemia enriquecidos con microalgas y otros suplementos nutricionales*. Compostela, Chile: Universidad Santiago de Compostela.
- Fernández, C., & Parodi, E. (2005). *Chlorococcales nuevas para el embalse Paso de las Piedras (Buenos Aires, Argentina)*. *ScieLo*, 40, 3-4.
- Fernández, G., & Johnston, M. (2006). *Crecimiento y temperatura*. En F. Squeo, & L. Cardemil, *Fisiología Vegetal*. Serena, Chile: Universidad de la Serena.
- Fingerhut, U., Groeneweg, J., & Soeder, C. (1990). *Acetate utilization in Scenedesmus falcatus, an alga from high rade ponds*. *Arch. Hydrobiol*, 87, 57-64.
- Gao, K. (1998). *Chinese studies on edible blue-green alga, Nostoc flagelliforme*. *Appl Phycol*, 10, 37-49.
- García, D. (1988). *Productos biotecnológicos de microalgas marinas*. España: Universidad Santiago de Compostela. Recuperado el 17 de 04 de 2015
- García, S., & Pérez, R. (2012). *Aspecos analíticos sobre la determinación de compuestos carotenoidesen microalgasmediante cromatografía de líquidos con detector de diodos*. Madrid.
- Ginsburg, M. (1987). *Dunaliella: a green alga adapted to salt. Advances in botanical research* (Vol. 14).
- Gómez, M. (2008). *La papa, su comercialización y el caso especial frente a la comunidad de Pasquilla*. Bogotá, Colombia: Escuela Superior de Administración Pública.
- González, B., Buitrago, E., & Frontado, K. (1999). *Evaluación de medios nutritivos para el crecimeinto de tres microalgas marinas de uso omún en acuicultura* (Vol. LIX).
- Goodwin, T. (1980). *The biochemestry of the carotenoids* (2 ed., Vol. 1). London: Chapman and Hall.
- Gourvenia, L., Batista, A., Sousa, L., Raymundo, A., & Bandarra, N. (2008). *Microalgae in novel food products*. Food Chemistry Research Developments.
- Guiry, M., & Guiry, G. (23 de Abril de 2002). *Algaebase*. Recuperado el 24 de Febrero de 2016, de http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=qab2200cd63a74189&-session=abv4:B5716219057902C30Bso142BC910

- Harker, M., Tsavalos, A., & Young, A. (1996). *Factors responsible for astaxanthin formation in the chlorophyte Haematococcus pluvialis*. *Bioresouce Technology*, 55, 207-214.
- Hindák, F. (1988). *Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae)*. Bratislava: IV Biologické Práce.
- Hiscox, J., & Israelslam, G. (1979). *A method for extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration*. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1332-1334.
- Jeffrey, S., & Humphrey, G. (1975). *New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 167, 191-194.
- Kimura, M., Rodríguez, A., & Godoy, T. (1990). *Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A*. *Food Chem*, 35, 187-195.
- Korshikov, A. (1953). *Taxonomie der palmelloiden Chlorococcales (Familie Palmogloeaceae)*. Kiev, Ucraina: Casa de Ucraina Academia de Ciencias de la RSS.
- Kumar, M., Miao, Z., & Wyatt, S. (2010). *Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculums source on growth of Chlorella vulgaris in digested piggery effluent culture medium*. *Bioresource Technology*, 101(15), 6012-6018.
- Lee, H., & Erickson, L. (1987). *Theoretical and experimental yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation*. *Biotechnol. Bioeng*, 29, 476-481.
- Lee, H., Lee, S., & Park, B. (1989). *The estimation of algal yield parameters associated with mixotrophic and photoheterotrophic growth under batch cultivation*. *Biomass*, 18, 153-160.
- Lichtenthaler, H. (1987). *Chlorophylls and Carotenoids pigments of photosynthetic biomenbranes*. *Methods in Enzimology*, 148, 350-382.
- Litdhfield, C., Colwell, R., & Prescott, J. (1969). *Numerical, taxonomy of heterotrophic bacteria growing in association with continuous culture Chlorella sorokiniana*. *Applied Microbiology*, 6, 127-131.
- López, E., Voltolina, D., Soto, N., & Figueroa, L. (2004). *Producción dey composición de microalgas en laboratorios comerciales del noreste de México*. Hermosillo, Sonora, México: Memorias del VII Simposium International de Nutrición Acuícua.

- Lorenz, R., & Cysewski, G. (2000). *Commercial potencial of Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin*. Trends Biotechnol (18), 160-167.
- Magazine. (2010). *Microalgas para la producción de biocombustibles y otras aplicaciones: una revisión*. Panorama acuicola.
- Maldonado, E. (2014). *Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga Graesiella emersonii (Chlorella emersoni) con sustratos amiláceos*. Tesis, 32-98.
- Mancilla, C., Castrejón, C., Rosas, T., Blanco, E., & Pérez, S. (Septiembre de 2012). *SlideShare. Obtenido de Extracción y separación de pigmentos vegetales*: <http://es.slideshare.net/puasd/extraccion-yseparaciondepigmentosvegetales>
- Martínez, A. (2010). *Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga Haematococcus pluvialis (Chlorophyta: volvocales) cultivada en diferentes medios*. Instituto Politécnico Nacional.
- Medina, A., Piña, P., Nieves, M., Arzola, F., & Guerrero, M. (2012). *La importancia de las microalgas*. Biodiversitas, 103, 1-5. Recuperado el 14 de 09 de 2015
- Meléndez, A., Vicario, I., & Heredia, F. (junio de 2004). *Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos*. Archivos latinoamericanos de nutrición, 54(2).
- Méndez, G., Solorza, F., Velásquez, V., Gómez, M., Paredes, L., & Bello, P. (2005). *Composición química y caracterización calorimétrica de híbridos y variedades de maíz cultivadas en México*. Agrociencia, 39, 267-274.
- MIES. (25 de Julio de 2011). *Ministerio de Inclusión Económica y Social*. Obtenido de <http://www.alimentatecuador.gob.ec/>
- Morales, E. (1996). *Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas*. Tesis doctoral, 16-80.
- Morales, E. (Julio de 2014). *Obtección de pigmentos fotosintéticos*. (E. Rodríguez, Entrevistador) Quito, Pichincha, Ecuador.
- Moreth, C., & Yentsch, C. (1970). *The role of chlorophyllase and light in the decomposition of chlorophyll from marine phytoplankton*. Journal of Experimental Biology and Ecology, 4, 238-249.
- Moronta, R., Mora, R., & Morales, E. (2006). *Respuesta de la microalga Chlorella sorokiniana al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas*. Scielo, 1-19.
- Moss, B. (1967). *A spectrophotometric method for stimation of porcentaje degradation of chlorophylls to phaeo-pigments extract of algae*. Limnology Oceanography, 12, 335-340.

- Myers, J. (1980). *On the algae: thoughts physiology and measurements of efficiency. In: primary productivity in the sea.* New York: Plenum Press.
- Nambara, E., & Marion Poll, A. (2005). *Absciscic acid biosynthesis and catabolism.* Annu Rev Plant Biol, 56, 165-185.
- Needham, J., & Needham, P. (1978). *Guía de estudio de los seres vivos de las aguas dulces.* Barcelona, Nápoles: Reverté S.A.
- Noma, Y., & Asakawa, Y. (1992). *Enantion and diastereoselectivity in the biotransformation of carveols by Euglena gracilis.* Phytochemistry, 31, 2009-2011.
- Novelo, E. (2012). *Flora del valle de Tehuacán - Cuicatlán.* México.
- Paniagua, J., Farfan, B., & Buckle, F. (1987). Culture of marine microalgae with natural biodigested resources. *Aquaculture*, 64, 249-256.
- Parés, R., Farrás, I., & Juárez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos.* Barcelona, España: Reverte.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. (2001). *Antioxidantes de los alimentos. Aplicaciones prácticas.* Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Primo, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria.*
- Ramírez, D. (2010). *Caracterización física, química y nutricional de la papa chaucha (Solanum phureja) cultivada en dos suelos edafoclimáticos del Ecuador, como base de estudio para la elaboración de una norma técnica (papa chaucha fresca requisitos 2010) por parte del INEN.* Quito, Pichincha, Ecuador: Universidad Tecnológica Equinoccial.
- Red Iberoamericana para el estudio de nuevos carotenoides bioactivos como ingredientes de alimentos. (2015). *Aislamiento de carotenoides por cromatografía de columna en fase normal.* Universidad de Sevilla. Sevilla: Ciencia y Tecnología para el desarrollo.
- Rodríguez, A. (1997). *Carotenoides y preparación de alimentos: la retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados.* Campiñas, Brasil: Universidad Estatal de Campiñas.
- Rodríguez, A. (1997). *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición.* Chile: Depósito de documentos de la FAO. Obtenido de Análisis de carotenoides: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/Ah833s20.htm>
- Rodríguez, A. (2010). *Biosíntesis de carotenoides en Escherichia coli y en tejidos no fotosintéticos de Arabidopsis thaliana.* Barcelona, España: Universidad de Barcelona.

- Rodríguez, D. (1997). *Análisis de carotenoides*. En C. Morón, I. Zacarías, & S. De Pablo, *Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición* (págs. 231-241). Santiago, Chile: FAO.
- Ronen, R., & Galloway, M. (1984). *Pigment extractions from lichens with dimethylsulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation*. *Environmental and Experimental Pollution*, 24(3), 239-245.
- Schoaf, W., & Liem, B. (1976). *Improved extraction of chlorophyll a and b algae using dimethyl sulfoxide*. *Limnology Oceanography*, 21, 926-928.
- SEMPLADES. (2009). *Plan Nacional para el Buen Vivir*. Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo del Ecuador.
- Srinivasan, D., Kirt, L., Owen, & Fenema, R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*.
- Strickland, J., & Parsons, T. (1972). *A practical handbook of seawaters analysis*. *Bull. Fish. Res. Bd. Can*, 167, 1-20.
- Sun, Z., Jin, L., & Junchao, H. (2011). *Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic Chlorella zofingiensis: Assessment of algal oils for diesel producción*. *Bioresource Technology*, 102(1), 100-120.
- Tanaka, A., Ito, H., Tanaka, R., Nobuaki, K., Tanaka, I., Yoshida, K., & Okada, K. (1998). *Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a*. *Plant Biology*, 12567-12854.
- Tandeau de Marsac, N., & Houmard, J. (1993). *Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms*. *Fems Microbiol*, 104, 100-190.
- Tecnoplades. S.A. (2014). *Protocolo de microalgas*. Centro Regional de Investigación Pesquera, 15-17. Manzanillo-Colima, México.
- Torres, A., Campostrini, E., Goncalves, J., & Yasmanishi, O. (2002). *Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in Carica papaya L*. *Plant Physiology*, 14.
- Universidad Nacional de Colombia. (2015). *Fisiología Vegetal. Pigmentos Fotosintéticos*. Recuperado el 28 de 04 de 2015, de http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000051/lecciones/cap02/02_04.htm
- Velásquez, M., & Ordorica, M. (2016). *Composición química de los seres vivos*. Apuntes de bioquímica médica.

- Vera, A., Yépez, M., Martínez, M., & León de Pinto, G. (2002). *Crecimiento mixotrófico de Chlorella sp. en medios enriquecidos con el exudado gomoso de Acacia tortuosa*. Revista CENIC Ciencias biológicas, 33, 19-22.
- Vila, A., Sedano, M., & López, A. (2003). *Correlación lineal y análisis de regresión*. Barcelona: Universidad Oberta de Catalunya.
- Wani, K., Naphade, B., Chaudhari, B., & Chincholkar, S. (2004). *Pigment Production, in Concise Encyclopedia Of Bbioresource Technology*.
- Wei, A., Zhang, X., Wei, D., & Chen, G. (2009). *Effects of cassava starch hydrolysate on cell growth and lipid accumulation of the heterotrophic microalgae Chlorella protothecoides*. Microbiol Biotechnol (36), 1345-1421.
- Wolf, M., Hepperle, D., & Krienitz, L. (2003). *On the phylogeny of Radiococcus, Planktosphaeria and Schizochlamydes (Radiococcaceae, Chlorophyta)*. Biologia, 58(4), 759-765.
- Yamagishi, T. (1998). *Photomicrographs of de freshwater algae*. Japón: Tokyo Uchida Rokakuho.
- Yeverino, M. (1997). *Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género Leucaena*. Monterrey, Mexico: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Yeverino, M. (1997). *Determinaciones cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género Leucaena*. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León.