

Evaluación de un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina para el crecimiento de *Haematococcus pluviialis* y la producción del pigmento astaxantina.

Erica Johana Quintero Gómez

Asesor interno

Msc. Ana Graciela Lancheros Díaz

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico

Bogotá - 11 de Noviembre 2020

| | |
|--|----|
| Introducción | 8 |
| 1. Planteamiento del problema | 10 |
| 2. Objetivos | 11 |
| 2.1 Objetivo general | 11 |
| 2.2 Objetivos específicos | 11 |
| 3. Justificación | 12 |
| 4. Antecedentes | 13 |
| 5. Marco teórico | 19 |
| 5.1 Generalidades de aguas residuales | 19 |
| 5.1.1 Aguas residual doméstica y agua residual porcina | 20 |
| 5.1.1.1 Características físicas | 21 |
| 5.1.1.2 Características químicas | 21 |
| 5.1.1.3 Características microbiológicas | 23 |
| 5.1.1.4 Contaminantes emergentes | 25 |
| 5.2 <i>Haematococcus pluvialis</i> | 26 |
| 5.2.1 Generalidades | 26 |
| 5.2.2 Ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i> | 26 |
| 5.2.3 Composición química | 27 |
| 5.2.4 Requerimientos nutricionales | 28 |
| 5.3 Astaxantina | 29 |
| 5.3.1 Generalidades | 29 |
| 5.3.2 Estructura química | 30 |
| 5.3.3 Síntesis de la astaxantina | 30 |
| 5.3.4 Fuentes de astaxantina | 32 |
| 5.3.5 Usos y aplicaciones de la astaxantina | 34 |
| 5.4 Clorofila | 35 |
| 5.4.1 Generalidades | 35 |
| 5.4.2 Estructura química | 36 |
| 5.4.3 Síntesis de clorofilas | 37 |
| 5.4.4 Fuentes de clorofila | 38 |
| 5.4.5 Usos y aplicaciones de la clorofila | 39 |

| | |
|---|----|
| 5.5 Técnicas de extracción de astaxantina y clorofila | 39 |
| 5.5.1 Espectrofotometría UV-VIS | 40 |
| 5.5.1.1 Espectrofotómetro | 41 |
| 5.5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia | 42 |
| 5.5.2.1 Cromatógrafo líquido | 42 |
| 6. Metodología | 45 |
| 6.1 Tipo de investigación | 45 |
| 6.2 Alcance de la investigación | 45 |
| 6.3 Población objeto de estudio | 45 |
| 6.4 Muestra | 45 |
| 6.5 Variables | 45 |
| 6.5.1 Variable independiente | 46 |
| 6.5.2 Variable dependiente | 46 |
| 6.6 Indicadores | 46 |
| 6.7 Método utilizado | 46 |
| 6.7.1 Técnicas y procedimientos | 46 |
| 6.7.2 Microorganismo | 47 |
| 6.7.3 Preparación de preinóculo | 47 |
| 6.7.4 Muestras de agua residual | 48 |
| 6.7.5 Medios de cultivo | 48 |
| 6.7.6 Condiciones ambientales en fase de crecimiento celular | 48 |
| 6.7.7 Conteo celular | 49 |
| 6.7.8 Condiciones ambientales para la producción de astaxantina | 49 |
| 6.7.9 Extracción de clorofila y astaxantina | 49 |
| 6.7.10 Cuantificación de clorofila y astaxantina | 50 |
| 6.7.11 Cambios morfológicos | 50 |
| 6.7.12 Control de calidad | 50 |
| 6.8 Análisis estadístico de los datos | 50 |
| 7. Resultados | 52 |
| 7.1 Fase de crecimiento celular | 52 |
| 7.1.1 Medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12.5% para <i>Haematococcus pluvialis</i> durante la fase de crecimiento | 52 |

| | |
|--|----|
| 7.1.2 Cambios morfológicos de <i>Haematococcus pluvialis</i> en los medios de cultivo durante la fase de crecimiento | 53 |
| 7.1.3 Cinética de crecimiento | 56 |
| 7.2 Fase de estrés celular | 59 |
| 7.2.1 Medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12.5% para <i>Haematococcus pluvialis</i> durante la fase de estrés celular | 59 |
| 7.2.2 Cambios morfológicos de <i>Haematococcus pluvialis</i> en los medios de cultivo durante la fase de estrés celular | 60 |
| 7.2.3 Determinación de pH inicial y pH final de los medios de cultivo | 63 |
| 7.3 Determinación de clorofila y astaxantina | 64 |
| 8. Discusión..... | 69 |
| 9. Conclusiones..... | 74 |
| Anexos | 76 |
| Referencias..... | 81 |

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas..... | 54 |
| Tabla 2. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas | 56 |
| Tabla 3. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los medios de cultivos y cepas de <i>H. pluvialis</i> evaluadas..... | 59 |
| Tabla 4. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas..... | 62 |
| Tabla 5. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas | 63 |
| Tabla 6. Resultados de pH en medios de cultivo inicial y medios de cultivo al final del ensayo..... | 64 |
| Tabla 7. Resultados de la cuantificación de astaxantina durante la fase de estrés por espectrofotometría..... | 67 |
| Tabla 8. Resultados de la cuantificación final de Astaxantina por HPLC..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Fig. 1 Ciclo de vida de <i>Haematococcus pluvialis</i> | 27 |
| Fig. 2 Estructura química de Astaxantina | 30 |
| Fig. 3 Biosíntesis de astaxantina en <i>Haematococcus pluvialis</i> | 33 |
| Fig. 4 Estructuras químicas de clorofilas naturales..... | 37 |
| Fig. 5 Esquema de general de un Cromatógrafo líquido..... | 45 |
| Fig.6 Medio volvox con preinóculo de UTEX 2505 y UA de <i>Haematococcus Pluvialis</i> | 48 |
| Fig. 7 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 8 | 52 |
| Fig. 8 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 15 | 53 |
| Fig. 9 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 29 | 53 |
| Fig. 10 Curva de crecimiento de la cepa UTEX 2505 de <i>H. pluvialis</i> en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5% | 57 |
| Fig. 11 Curva de crecimiento de la cepa UA de <i>H. pluvialis</i> en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5% | 58 |
| Fig. 12 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 1 de estrés celular..... | 60 |
| Fig. 13 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 2 de estrés celular..... | 60 |
| Fig. 14 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 3 de estrés celular..... | 61 |
| Fig. 15 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 4 de estrés celular..... | 61 |
| Fig. 16 Curva de calibración de clorofila | 65 |
| Fig. 17 Curva de calibración de astaxantina | 66 |
| Fig. 18 Concentración de clorofila durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P y control | 67 |
| Fig. 19 Concentración de astaxantina durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P..... | 67 |

Lista de anexos

Pág.

Anexo 1. Ajuste de datos para curvas de crecimiento celular de los medios de cultivo a partir de aguas residuales domesticas (A.R.D) y aguas residuales porcinas (A.R.P) con las cepas UTEX 2505 y UA 77

Anexo 2. Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo...79

Anexo 3. Resultados cromatografía liquida de alta resolución80

Resumen

Las descargas de aguas residuales a otras fuentes de agua causan un impacto negativo por sustancias tóxicas que afectan la fauna acuática y la salud humana, por lo que esta problemática ha hecho que se busquen alternativas que contribuyan a un mejor tratamiento de estos desechos. El estudio de las microalgas como opción de tratamiento para las aguas residuales ha tomado auge en los últimos años, buscando la manera de aprovechar este recurso en simultáneo con la producción de bioproductos de alto valor e interés en la industria farmacéutica y alimenticia. Esta investigación evaluó un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* y la síntesis y acumulación de la astaxantina.

El estudio evidenció que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas generó mayor concentración celular con la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis*, siendo de 3409×10^4 células/mL, comparado con el medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas. Además, se demostró que para una confianza del 95% existen diferencias estadísticamente significativas ($P= 0,05$) entre las medias de crecimiento de las cepas de *H. pluvialis*. Por otro lado, la concentración final de astaxantina fue mayor con la cepa UA de *H. pluvialis* en el medio de cultivo de aguas residuales domésticas obtenidas mediante la técnica espectrofotométrica y de cromatografía líquida de alta eficiencia, siendo 4,9 ug/mL y 27,091 ug/mL respectivamente. Estos resultados demuestran la obtención de astaxantina mediante el uso de aguas residuales.

Palabras clave: Aguas residuales, microalgas, *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, clorofila.

Introducción

Según la Organización de las Naciones Unidas, más del 80% de las aguas residuales resultantes de actividades humanas son vertidas en ríos, cuencas y mares sin ningún tratamiento, provocando su contaminación. Estos desechos albergan altos contenidos químicos orgánicos e inorgánicos como el nitrógeno y el fósforo, microorganismos como bacterias, virus y parásitos, además de contaminantes emergentes como compuestos químicos farmacéuticos, sus metabolitos y hormonas que incluso las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no son capaces de eliminar, impactando fuertemente el medio ambiente y la salud humana²⁰.

Especies de microalgas se han estudiado para tratar de manera eficiente las aguas residuales de origen industrial, ganadero, municipal y agrícola en simultáneo con la producción de bioproductos como suplementos alimenticios y para la salud, cosméticos, pigmentos, vitaminas, antioxidantes, biocombustible entre otros. *Haematococcus pluvialis* es una microalga verde de agua dulce y la mejor productora natural de astaxantina acumulando hasta el 4% de su peso seco. La astaxantina es un importante pigmento carotenoide que se caracteriza por sus propiedades como colorante, grado alimenticio, capacidad antioxidante, siendo ampliamente utilizada en el área de la industria acuicultora, alimentaria, farmacéutica y en la salud humana⁶.

El cultivo de esta microalga para su consecuente producción de pigmento a escala industrial en medios convencionales basados en sistemas de cultivo abiertos y cerrados no es suficiente; es por ello que se plantea la opción del cultivo en un medio a partir de aguas residuales que son un recurso que incluye líquidos y sólidos acuáticos de uso doméstico o comercial, así como otras aguas que se han utilizado en actividades del hombre y cuya calidad ha sido degradada, pero que alberga un amplio valor nutricional necesario para el crecimiento y la producción de biomasa de *H. pluvialis*, caracterizándose por ser una alternativa eco- amigable. Por consiguiente

el objetivo del presente estudio es evaluar un medio de cultivo a partir de aguas residuales para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la obtención de su pigmento, la astaxantina.

1. Planteamiento del problema

Las descargas de aguas residuales a otras fuentes de agua son reconocidas como uno de los principales problemas de contaminación acuática en el mundo. Dichas descargas de aguas residuales sin tratamientos previos, generan problemas ambientales como el agotamiento del oxígeno disuelto en el agua corriente para ser utilizado por la materia orgánica presente en el agua residual, la generación de gases de olores putrefactos por la descomposición de compuestos orgánicos, la carga elevada de microorganismos y compuestos tóxicos las convierten en un factor crítico a nivel ecológico y sanitario al contaminar afluentes como ríos y lagos, conllevando a un desequilibrio ecológico.

Sin embargo, es importante resaltar el potencial que este recurso presenta, ya que por sus componentes cuenta con un elevado valor nutricional que permite estimular el crecimiento y proliferación de microalgas, convirtiéndose en un medio adecuado para la generación las mismas. Es así como este proyecto pretende dar respuesta a la pregunta, ¿por qué las aguas residuales pueden resultar ser un medio de cultivo ideal para el crecimiento de *H. pluvialis*?. Con todo lo anterior, también se pretende contribuir a reducir los efectos nocivos sobre el medio ambiente y la salud humana siendo las aguas residuales un recurso amigable con el ambiente que disminuye los costos por ser un elemento de desecho de fácil adquisición para realizar el cultivo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar un medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y porcinas para el crecimiento de *Haematococcus pluvialis* y la obtención del pigmento astaxantina.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar las características de las aguas residuales domésticas y porcinas mediante revisión bibliográfica.
- Establecer las condiciones necesarias para la producción de *Haematococcus pluvialis* y astaxantina en el medio de cultivo a partir de aguas residuales de origen doméstico y porcino.
- Evaluar el crecimiento del alga y la producción de clorofila y astaxantina en el medio de cultivo de aguas residuales domésticas y porcinas.

3. Justificación

Haematococcus pluvialis es una microalga importante a nivel industrial debido que en su estado de quiste es capaz de producir Astaxantina, un carotenoide que se caracteriza por ser aplicado a productos industriales como alimentos y fármacos, además de sus múltiples beneficios en la salud. La producción de la microalga y el pigmento tiene algunas limitaciones debido a que su nivel de crecimiento es lento y los costos generados para su obtención son elevados, pues requiere de condiciones nutricionales específicas relacionadas con las concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio, fuente de CO₂, intensidades lumínicas y de temperatura adecuados para la producción de biomasa. Las concentraciones de dichos nutrientes y otros adicionales, están presentes en las aguas residuales de origen doméstico y porcino, lo que permite catalogar a este recurso como un posible medio de cultivo que propicia los requerimientos nutricionales ideales para el desarrollo de *Haematococcus pluvialis*, siendo una alternativa amigable con el ambiente. Por ello, se plantea utilizar este recurso como medio de cultivo para la generación de *Haematococcus pluvialis* y la consecuente producción del pigmento astaxantina.

4. Antecedentes

En un primer trabajo de Oswald. *et al.*¹ 1957, menciona el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales por tener las características nutricionales adecuadas para su desarrollo por un tiempo suficiente y bajo condiciones de luz y temperatura propicias. Sin embargo, el crecimiento de las microalgas puede verse afectada por los materiales tóxicos contenidos en las aguas residuales. Además, infiere que el uso de las microalgas es un comienzo para tratar aguas residuales y así mismo obtener subproductos en un futuro.

En el trabajo de Kang. *et al.*² 2006, describen un sistema fotoautotrófico con la microalga *H. pluvialis* para el tratamiento de aguas residuales tratadas primariamente (PTS) y aguas residuales porcinas tratadas primariamente (PTP), ya que debido a su variación en las concentraciones de nitrato necesario para el desarrollo del alga, permite la eliminación de fósforo y nitrógeno para la posterior síntesis y producción de astaxantina por quistes rojos de *H. pluvialis*.

Los resultados arrojaron que *H. pluvialis* tuvo un buen crecimiento en el sistema de PTS con una tasa de crecimiento promedio de 0,239 día. En cuanto a los niveles de nitrato y fosfato, estos se eliminaron completamente a causa del crecimiento celular. Para el cultivo de *H. pluvialis* en PTP, el medio se diluyó 2, 4 y 8 veces, demostrando que el crecimiento celular en el medio diluido dos veces fue inhibido por la carga abundante de desechos inorgánicos. En el medio diluido cuatro veces, las células vegetativas de *H. pluvialis* presentaron un crecimiento óptimo con una tasa de crecimiento de 0,245 día y la adecuada eliminación de nitrato y fosfato. En medio PTP diluido ocho veces el crecimiento celular estuvo limitado por el agotamiento temprano de nitrógeno. La concentración de astaxantina fue de 39,7 mg /L en PTS, 83,9 mg /L en medio PTP diluido cuatro veces y 42,3 mg/ L para PTP diluido ocho veces. En conclusión, el método propuesto contribuye al procesamiento de aguas residuales y la eliminación de residuos inorgánicos tras el cultivo de *H. pluvialis* y la producción sustancial de astaxantina.

En la investigación de Vidhyavathi *et al.*,³ 2008, se establece una relación entre el perfil de pigmento y el perfil de expresión de genes carotenogénicos bajo la influencia de disminución de nutrientes en combinación con cloruro de sodio, acetato de sodio e intensidad alta de luz. En este estudio se demostró que los genes para la biosíntesis de astaxantina, β -caroteno cetolasa (BKT) y β -caroteno hidroxilasa (CHY), se expresaban a nivel basal en las células verdes flageladas y durante el proceso de estrés los genes estaban regulados por el aumento en la concentración de otros genes como licopeno ciclasa (LCY), fitoeno sintasa (PSY) y fitoeno desaturasa (PDS). En los ensayos realizados, se evidencia que la máxima regulación positiva de genes carotenogénicos ocurría al adicionar acetato de sodio y acetato de sodio con cloruro de sodio pues inducen estrés salino y además de ello, los autores de la investigación sugieren que el acetato mejora la acumulación de astaxantina por medio del control redox fotosintético.

Las condiciones de estrés ambiental en los cultivos de *H. pluvialis* en estado de células vegetativas verdes, permiten la acumulación de astaxantina al cambiar morfológicamente a quistes rojos o aplanosporas por factores como la limitación de nutrientes, entre ellos los nitratos, fosfatos, sulfatos y magnesio, alta concentración de sal en el medio, elevada intensidad de luz y temperatura a la que se encuentra expuesto y pH que aumentan el contenido total de carotenoides y el de la astaxantina. Estos factores dan paso a la expresión de genes carotenoides como fitoeno sintasa, licopeno ciclasa, caroteno ketolasa y fitoeno desaturasa. Finalmente, concluyen que investigaciones acerca de la aplicación de todos los factores al tiempo y de los genes carotenogénicos son limitados. Camacho *et al.*,⁴ 2013.

Wu *et al.*,⁵ 2013 en se investigó la eliminación de nutrientes junto con la producción de biomasa y la acumulación de lípidos en la microalga. La muestra se obtuvo de una planta de tratamiento de aguas residuales en Beijing y *H. pluvialis* demostró un crecimiento significativo con una densidad máxima de $8,5 \times 10^4$ células /mL siendo más alta que en especies de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* La eliminación del fósforo y nitrógeno por *H. pluvialis* en este estudio fue de 93,8% y 97,3% respectivamente al alcanzar la etapa estacionaria. Por otro lado, el contenido lípidos

aumento un 43% con la deficiencia de nutrientes del medio a partir de aguas residuales.

Para Guang *et al.*,⁶ 2014, las descargas de aguas residuales sin previo tratamiento incrementa el riesgo de afectación al medio ambiente y a la salud pública, ya que las aguas residuales domésticas presentan altas concentraciones de contaminantes como nitrógeno y fósforo, productos químicos de cuidado personal, productos farmacéuticos y disruptores endocrinos. El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales no solo asimila completamente la cantidad de nitrógeno y fósforo para su crecimiento en el medio, sino que también tiene la capacidad para eliminar contaminantes orgánicos y metales pesados. Este estudio busca evaluar la capacidad de cuatro especies de microalgas como *C. reinhardtii*, *S. obliquus*, *C. pyrenoidosa* y *C. vulgaris* para la eliminación simultánea de los contaminantes ya mencionados en aguas residuales.

Los resultados demuestran que la remoción de nitrógeno y fósforo total por las especies de algas utilizadas fueron eficientes con una buena tasa de crecimiento celular. Relacionado a la eliminación de metales, solo Al, Au, Co, Fe, Hg, Mn, Pb y Zn presentaron más del 50% de eliminación en el medio, mientras que As, Cd, Cr, Ni y Sn mostró eliminación menor al 50%. Los compuestos orgánicos y los disruptores endocrinos de tipo estrogénico también fueron significativamente reducidos por el tratamiento aplicado, concluyendo que las especies de microalgas utilizadas son potenciales para su aplicación en los tratamientos de aguas residuales.

En el trabajo de Sato *et al.*,⁷ 2015, describen el tratamiento de aguas residuales con la implicación de ozonización, coagulación, desarrollo y optimización para el cultivo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. En este estudio se tomaron muestras de una planta de tratamiento de aguas residuales en su mayoría domésticas de Okayama, Japón. Tras la coagulación de la muestra con quitosano, la turbidez del medio disminuyó un 89% permitiendo que el sobrenadante de la muestra quedara con los nutrientes necesarios siendo adecuado como medio de cultivo para *H.*

pluvialis. Según los resultados del estudio, las concentraciones totales de nitrógeno y fósforo disminuyen con el crecimiento celular. Estos resultados muestran que el $99 \pm 1,4\%$, $99\% \pm 1\%$ de nitrógeno (días 31 - 35) y $90,3 \pm 7,6\%$, $90\% \pm 8\%$ de fósforo (días 31 - 35) se eliminaron por el cultivo de *H. pluvialis*. Además, la tasa de crecimiento en agua residual filtrada y coagulada fue de 0,34 células/día con 5% de CO₂, siendo superior a la tasa de crecimiento en medio convencional que fue de 0,29 células/día con suministro de aire y la producción de astaxantina fue de 3.26 mg / L. En los resultados del trabajo se evidencia al agua residual doméstica como medio para el cultivo de *H. pluvialis* teniendo una tasa de crecimiento mayor que en el medio convencional que trabajaron paralelamente con este estudio. Sin embargo, mencionan que se requiere una mejor optimización para lograr aumentar la producción eficiente de astaxantina.

En la investigación de Ledda *et al.*,⁸ 2016, realizaron una suspensión de aguas residuales porcinas tras un proceso de filtrado para eliminar la turbidez del medio, funcionando como sustrato para *H. pluvialis* y la producción de biomasa. Los resultados obtenidos demostraron que el sistema de filtrado pudo reducir la concentración de compuestos presentes en las aguas residuales de los cerdos siendo positivas para el cultivo de microalgas en términos, de turbidez y reducción de amoníaco. Los experimentos realizados con filtrados diluidos al 25% y 12,5% mostraron el crecimiento más rápido, alcanzando la fase estacionaria en 13 días con una concentración de peso seco promedio de 0,97 g/L y 0,81 g/L respectivamente.

La acumulación de astaxantina se evidenció en el filtrado diluido al 50% con $1,27 \pm 0.02\%$ de peso seco, ligeramente aumentado en comparación con el filtrado diluido al 12,5% con $1,17 \pm 0.02\%$ de peso seco y el filtrado diluido al 25% con $0,92 \pm 0.02\%$ de peso seco. Se concluye que el método propuesto tiene potencial como un proceso de tratamiento biológico de aguas residuales por la eliminación de compuestos inorgánicos y la biosíntesis simultánea de astaxantina.

El cultivo de las microalgas en condiciones específicas de estrés tiene la capacidad de sintetizar y acumular metabolitos secundarios como el pigmento carotenoide astaxantina. La microalga *Haematococcus pluvialis* acumula dentro de sus células la astaxantina que ocupa hasta el 4% de su peso seco. *H. pluvialis* cuenta con dos etapas: la primera es una etapa vegetativa en que las células se dividen y sintetizan clorofila en condiciones adecuadas de luz, temperatura, nutrientes como nitrógeno, fósforo, sodio, azufre, magnesio, hierro, zinc, cobre, cobalto y pH adecuados. La segunda etapa consiste en la acumulación de astaxantina, donde la división celular se detiene debido a la privación de nutrientes en el medio y por la exposición a factores de estrés como alta intensidad de luz y estrés salino. Panis *et al.*,⁹ 2016.

Guldhe *et al.*,¹⁰ 2017, menciona que las aguas residuales domésticas están compuestas de material orgánico, nitrógeno y fósforo, metales, materia orgánica y microorganismos. También son ricas en fosfatos y amoníaco como nutrientes importantes para el crecimiento de las microalgas. Sin embargo, altas concentraciones de dichos componentes pueden afectar negativamente el crecimiento pues juegan un papel importante en la dispersión y penetración de la luz al medio. Otro factor que puede influir en el desarrollo de las microalgas son las grandes cantidades de bacterias por ataque directo a través del contacto de célula a célula o por ataque indirecto que se lleva a cabo por compuestos extracelulares. Sin embargo, las microalgas también pueden influir negativamente en el proceso de crecimiento bacteriano al aumentar la concentración de OD, pH y la eliminación de metabolitos con capacidad inhibitoria. Los principales componentes de las aguas residuales de origen agrícola como las porcinas, presentan los desechos más contaminantes por su contenido orgánico relacionado a la demanda biológica de oxígeno, comparada con otras fuentes de aguas residuales de origen animal. Además, hace referencia a que las aguas residuales con estiércol de origen animal pueden ser un medio de cultivo ideal para las microalgas.

Para Chew *et al.*,¹¹ 2018, las aguas residuales son una fuente de gran potencial para el cultivo de las microalgas. Este medio es una fuente rica en nutrientes que el alga a medida que utiliza para su crecimiento, purifica el agua para poder ser

descargada posteriormente. Las aguas residuales se pueden clasificar en domésticas, agrícolas, industriales, refinería y lixiviados. Los contenidos de las aguas residuales tienen contenidos orgánicos como grasas, carbohidratos, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles similares, pero hay diferencias en cuanto a la materia inorgánica contenida que incluye concentraciones variables de calcio, cloro, fósforo, bicarbonato, amonio, azufre, sodio, bicarbonato, amonio y metales pesados. Además, altas cantidades de nitrógeno y fosfatos que pueden causar procesos de eutrofización y pérdida de vida acuática si se descargan a otras fuentes de agua. Es importante destacar que no todas las especies de algas resisten las condiciones del medio a causa de su alto contenido nutricional y agentes patógenos que no permiten llevar a cabo el desarrollo y productividad de las microalgas.

Según Halip *et al.* ¹² en *Assessing the feasibility of microalgae cultivation in agricultural wastewater: the nutrient characteristics*. Este estudio demuestra el cultivo de microalgas en aguas residuales que se caracterizan por tener una alta carga de nutrientes consumibles, siendo consideradas ideales en el campo de la remediación de estos efluentes y la producción de biomasa. Las concentraciones de carbono, fósforo y nitrógeno fueron suficientes en el medio junto con otros oligoelementos esenciales para las microalgas como el Fe, K y Mg. Sin embargo, un nivel excesivo de estos nutrientes resultan tóxicos para las microalgas y por tanto retardan su capacidad de crecimiento en el medio.

5. Marco teórico

5.1 Generalidades de aguas residuales

El incremento en la demanda de agua tiene como consecuencia un aumento en el volumen de los residuos líquidos, cuya descarga, sin una adecuada recolección, evacuación y tratamiento, es capaz de deteriorar la calidad otras fuentes de agua y contribuye su vez a las problemáticas acerca de la disponibilidad del recurso hídrico. Las aguas residuales son aquellas que por el uso del ser humano representan un peligro y deben ser tratadas y desechadas debido a la elevada concentración de sustancias y microorganismos presentes. Su composición es una mezcla compleja de materia orgánica e inorgánica, junto con entidades biológicas como bacterias y virus, reflejo de los estilos de vida de la sociedad.¹³

La composición física de las aguas residuales está dada principalmente por agua, arena y sedimento, además de productos sanitarios y plástico. Dependiendo del lugar se pueden encontrar restos vegetales, ramas o animales en la red de alcantarillado que transporta las aguas residuales. Por otro lado, las sustancias químicas en los desechos domésticos comprenden lípidos, carbohidratos y proteínas, fósforo, nitrógeno, potasio, calcio, cloro, azufre, bicarbonato, amonio y metales pesados.^{11,14} En cuanto a la naturaleza microbiológica, las bacterias representan más de 10^{12} células/ litro; siendo los géneros *Bacillus* y *Clostridium* los que están en mayor cantidad y son capaces de resistir las condiciones extremas de dicho medio formando esporas. Entre los microorganismos entéricos presentes se encuentran *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella*, acompañado de especies como *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* y *Streptococcus*. Los virus como Cocksackievirus, virus de la Hepatitis A, Adenovirus y Rotavirus hacen parte de dicho complejo microbiológico. En cuanto a protozoos es posible determinar amebas, flagelados y ciliados como *Giardia* y *Cryptosporidium*. Finalmente, los géneros de hongos más encontrados en aguas residuales son *Geotrichum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Sphaerotilus*, *Aerobasidium*, entre otros.¹⁴

Una forma para el tratamiento de estos efluentes es la utilización de procesos basados en microalgas. En comparación con los procesos de tratamiento físico y químico, el tratamiento a base de microalgas puede lograr la eliminación de nutrientes de las aguas residuales de una manera menos costosa y ecológicamente más segura, con beneficios adicionales como la producción de biomasa. Las aguas residuales representan un medio líquido potencial para el cultivo de microalgas por su alto contenido de nutrientes necesarios para su crecimiento, desarrollo y producción. Es importante destacar que los contenidos de nitratos y fosfatos contenidos en el agua residual al ser descargadas en otras fuentes de agua puede ser causante de procesos de eutrofización y disminución de la vida acuática allí existente. Las tendencias actuales de las aguas residuales utilizadas, establecen que las más apropiadas con una relación de N:P adecuado provienen de la industria láctea, aguas residuales domésticas e industria porcina.¹¹

5.1.1 Agua residual doméstica y agua residual porcina.

La composición de las aguas residuales varía según las fuentes e influye en el crecimiento de las microalgas. El agua residual domestica proviene de desechos de origen humano o animal como heces y orina, residuos por limpieza del hogar y de aseo personal con pocas concentraciones de solidos orgánicos e inorgánicos suspendidos y disueltos. Se caracteriza porque su contenido presenta grasas, restos de jabón y detergentes, materia orgánica y microorganismos. Los desechos generados que son contenidos en el agua residual se conforman en su mayoría por sustancias como ácidos, aceites y antibióticos, además de productos que contengan naturaleza mineral, animal o vegetal.^{13, 15}

El agua residual porcina proveniente de la cría de cerdos está conformada por heces, orina, residuos de comida y agua utilizada para la limpieza de la zona de criadero por lo que la eliminación de la materia orgánica, del nitrógeno y fósforo requiere de atención, pues su eliminación en otras fuentes de agua degrada su calidad, generando un impacto ambiental negativo y un alto potencial de eutrofización.^{16,17}

5.1.1.1 Características físicas.

- El color del agua residual es representativo del tiempo que lleva descartada. La apariencia negra u oscura es un indicador de residuos sépticos, mientras que el color gris representa aguas que recientemente han sido desechadas.¹⁸
- El olor es indicativo de la descomposición de materia orgánica con la producción de gases como el metano y sulfuro de hidrogeno en el que los microorganismos anaerobios reducen el sulfato a sulfuro como *Desulfovibrio*, *Desulfotamaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus* y *Desulfuromonas*.^{18,19}
- La temperatura del agua residual depende de la ubicación geográfica y de la energía liberada tras las reacciones bioquímicas en la degradación de la materia orgánica. Sin embargo, oscila entre 10 a 21°C y resulta ser un factor importante en altas temperaturas debido a su efecto en el crecimiento de especies planctónicas y de hongos.¹⁸
- Los sólidos totales se clasifican en solidos suspendido y solidos filtrables. Los primeros hace referencia a partículas de origen vegetal, animal o de desechos que pueden ser identificados y retirados con facilidad mediante métodos físicos. Por otro lado, los sólidos filtrables se caracterizan por que tienen un diámetro de 1 micra que puede ser eliminado mediante sedimentación y por moléculas orgánicas e inorgánicas que están disueltas en el agua.²⁰

5.1.1.2 Características químicas.

- La fracción orgánica de las aguas residuales tanto domesticas como porcinas está constituida por combinación de carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno que constituyen proteínas que representan entre 40-60%, lípidos 10% y

carbohidratos de 25 - 50%, grasas, urea y agentes tensoactivos provenientes de restos de alimentos, orina, excremento y detergentes. El contenido de materia orgánica biodegradable reduce el oxígeno del agua y pueden ser transformados a compuestos simples mediante los microorganismos presentes. En cambio, la materia orgánica no biodegradable resulta ser un obstáculo en el tratamiento de esta clase de agua. ^{15,18,20}

- Las sustancias inorgánicas en aguas residuales domésticas y porcinas contienen altas concentraciones de nitrógeno y fósforo que pueden provocar la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. Además de la presencia de otras sustancias presentes como cloruro, iones de hidrógeno y metales pesados como plomo, zinc, mercurio, cobre y cadmio. ^{15,21}

Mediante procesos bioquímicos, el nitrógeno se puede encontrar en diferentes formas y estados de oxidación. Tiene la capacidad de consumir el oxígeno disuelto por procesos de conversión de amoníaco a nitritos, en la nitrificación de nitritos a nitratos y en la desnitrificación los nitratos son reducidos a gas nitrógeno. La forma predominante en el agua residual es nitrógeno orgánico correspondiente a grupos amino y amoníaco derivado de la urea. ¹⁷ Altas concentraciones de este nutriente en aguas residuales tratadas o por su acumulación en el suelo y mediante la escorrentía son depositadas en cuerpos de agua dando lugar a procesos de eutrofización, reducción del oxígeno, aumento de la turbiedad y causa de la muerte de flora y fauna alterando la función de los efluentes y la calidad del agua. ^{22,23,24}

El fósforo total presente en aguas residuales domésticas y porcinas se encuentran forma de fosfatos distribuido en inorgánicos como polifosfatos y después de un proceso de hidrólisis lenta en ortofosfatos provenientes de productos químicos y detergentes. ²¹

El fósforo representa un nutriente esencial para el crecimiento de microorganismos que intervienen en la materia orgánica de las aguas residuales pero altas concentraciones depositadas en aguas receptoras contribuye a la formación de floraciones de algas y puede representar una fuente tóxica para los peces y los humanos.²⁵

El agua residual doméstica contiene menores concentraciones de nitrógeno y fósforo total con 15–90 mg/L y 5-20mg /L respectivamente, comparado con aguas residuales de fuente porcina con nitrógeno total entre 1110-3213 mg/L y fósforo total 310-987 mg/L. Estos datos se encuentran bajo la influencia de factores como la edad, la dieta, la productividad, el manejo y la ubicación de los animales.²⁴

- Dentro de los gases encontrados en aguas residuales está el oxígeno disuelto, el cual es necesario para la actividad química y biológica evitando la formación de olores desagradables. El ácido sulfhídrico, producido por la descomposición de materia orgánica con azufre son un indicativo del tiempo que lleva el agua residual y otros gases como el metano causante de efecto invernadero, óxido nítrico, el dióxido de carbono, amoníaco, mercaptano y ácidos orgánicos volátiles son producto de la descomposición.¹⁸

5.1.1.3 Características microbiológicas.

Las aguas residuales domésticas y porcinas representan una fuente con diversidad de patógenos como bacterias, virus, protozoos y helmintos provenientes de heces de origen humano y animal que son un riesgo para la salud.²⁶

- La fuente de bacterias patógenas en las aguas residuales son las excreciones de animales o humanos en las que se encuentran parte del microbioma normal del huésped y que pueden encontrar en este tipo de agua un ambiente adecuado para proliferar o por el contrario, ser eliminados. Este gran conjunto de bacterias tienen la capacidad de adquirir genes de resistencia a los

antibióticos representando un problema para la salud. Géneros como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Helicobacter*, *Campylobacter*, *Bacillus*, *Listeria* y *Leptospira* que pueden ser causantes de enfermedades gastrointestinales, neumonía, meningitis, tuberculosis, entre otras.^{26,27}

- El agua residual es una fuente de patógenos virales proveniente de la materia fecal de personas infectadas y representa un riesgo para la salud humana asociada a patologías transmitidos por el agua como gastroenteritis y hepatitis. El proceso de tratamiento para la eliminación de bacterias en las aguas residuales, es ineficaz para las partículas virales que al final son depositadas en otras fuentes de agua para uso agrícola o recreacional.^{26,28,29}

Los virus entéricos como Adenovirus, Rotavirus, Virus de la hepatitis A y Virus de la hepatitis E, Norovirus, Virus Coxsackie A y B y Virus del polio hacen parte de estos patógenos encontrados en las aguas residuales domésticas.³⁰ El virus SARS-CoV-2 causante de la pandemia del COVID-19, se elimina en la saliva, esputo y heces que posteriormente se desechan en las aguas residuales y en la que se ha reportado presencia de su ARN mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-qPCR), siendo un posible factor de riesgo y fuente de la enfermedad. Sin embargo, aún hacen falta estudios para evaluar la persistencia del virus en este medio frente a las diferentes condiciones y a los procesos de inactivación o eliminación en los procesos de tratamiento.^{31,32}

- Las descargas de aguas residuales resultan ser un vehículo importante para la trasmisión de parásitos por el agua. Los géneros de *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Ascaris*, *Taenia*, *Entamoeba*, *Hymenolepis nana* y *Enterobius vermicularis* son algunos que se encuentran en ese medio y que son un potencial riesgo para la salud cuando se da lugar una exposición accidental en estadios infectantes de los parásitos cuando se realizan actividades de

rehúso del agua residual como el riego, la recreación, entre otros aplicaciones.^{33,34}

5.1.1.4 Contaminantes emergentes.

Los contaminantes emergentes son los compuestos de diferente origen y naturaleza química y su presencia en el medio ambiente ocurre a través de aguas residuales y otras actividades. Las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales no tienen la capacidad de eliminar muchos de estos compuestos, teniendo la capacidad para generar un impacto ecológico en los cuerpos de agua receptores y en la salud.

^{35,36}

Los fármacos más frecuentemente encontrados abarcan antidepresivos, antiretrovirales, analgésicos, antiinflamatorios, agentes ansiolíticos, medicamentos antidiabéticos, diuréticos, antibióticos, antiepilépticos, broncodilatadores y hormonas que pueden ser metabolizados total o parcialmente en los organismos conduciendo a la excreción de los fármacos originales y metabolitos eliminados por la orina y heces. Las aguas residuales porcinas también presentan hormonas esteroideas que influyen en la reproducción de peces, tortugas y ranas al inducir un crecimiento testicular anormal. ^{36,37}

Las drogas ilícitas como El Δ -9-tetrahidrocannabinol, componente psicoactivo del cannabis y la cocaína hacen parte de los contaminantes emergentes, ocasionando respuestas oxidativas y citotóxicas en los moluscos y demás organismos acuáticos. Es importante mencionar que países como Suiza y Alemania han tomado medidas para eliminar los microcontaminantes de las aguas residuales, sin embargo aún quedan varias sustancias peligrosas conocidas y desconocidas que se generan en los procesos de tratamiento y que continúan representando un peligro por su toxicidad en las aguas superficiales. ^{36,38}

5.2 *Haematococcus pluvialis*

5.2.1 Generalidades.

Haematococcus pluvialis es una microalga verde unicelular, fotosintética de agua dulce, perteneciente a la clase Chlorophyceae, orden Volvocales y familia *Haematococcaceae*. Es frecuente encontrar esta microalga en cuerpos de agua como estanques naturales distribuidos en regiones templadas del mundo y es considerada como la mejor fuente natural de astaxantina³⁹. La estructura de *H. pluvialis* se caracteriza por tener una pared celular de celulosa, los cloroplastos contienen pigmentos fotosintéticos con clorofila *a* y *b*, además de carotenoides como luteína, xantofilas y zeaxantina⁴⁰.

5.2.2 Ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*.

En su ciclo de vida tiene la capacidad de formar cuatro tipos de morfologías: macrozooides, microzooides, palmelas y hematocistos o aplanosporas. (Fig.1)

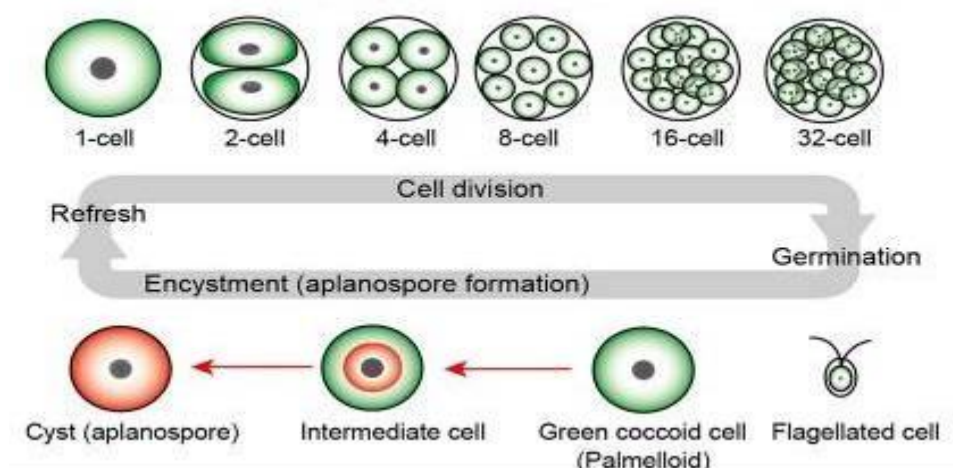


Fig. 1 Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products, Life cycle of *Haematococcus pluvialis*. 2020. Shah *et. Al*. Imagen disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848535/#B72>

La fase vegetativa verde está conformada por macrozooides que se caracterizan por tener una tamaño de 8 a 20 μm forma elipsoidal o esférica, un cloroplasto y dos flagelos de igual longitud. Está se divide de 2 a 32 células hijas mediante el proceso de mitosis. Los macrozooides predominan en estadios tempranos de crecimiento en la fase vegetativa en un cultivo con las condiciones óptimas. En algunas situaciones en las que *H. pluvialis* se expone a condiciones de privación de nutrientes, seguido por condiciones óptimas de cultivo, la gametogénesis puede ocurrir en aplanosporas, generando 64 gametos denominados microzooides. Los microzooides son de menor tamaño ($<10 \mu\text{m}$) y demuestran alta motilidad. Por otro lado, en el estadio de palmelas, las células se encuentran en reposo, su núcleo está en el centro de la célula, los cloroplastos se ubican en la periferia, no tienen flagelos y por ende pierden la movilidad. Esto ocurre cuando las condiciones ambientales no son ideales dando lugar a las células intermedias que cambian a color naranja, la fotosíntesis disminuye y hay presencia de gotas de lípidos con astaxantina. La fase de enquistamiento no móvil solo contiene los hematocistos o aplanosporas en donde se acumula la astaxantina en gotas de lípidos dispersos en el citoplasma. En su estructura contiene una vaina trilaminar rígida, gruesa y pared celular secundaria que permiten a la microalga resistir condiciones ambientales de estrés.³⁹

5.2.3 Composición química.

La composición bioquímica de *H. pluvialis* se modifica de acuerdo a la fase vegetativa y la fase de enquistamiento. En la primera fase, el contenido de carbohidratos en la célula está expresado en forma de almidón con un 15 a 17%, mientras que en fase de enquistamiento, debido a las condiciones ambientales extremas su contenido puede variar hasta el 74%. El contenido proteico bajo condiciones favorables, oscila entre el 29 al 45%, al tanto que en la fase de enquistamiento están representadas por aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico, leucina y alanina con un 23%. Los ácidos grasos poliinsaturados representan el 25% de la fracción lipídica en fase vegetativa de *H. pluvialis*, pero en fase de aplanospora la síntesis de lípidos neutros como triacilgliceroles aumenta. La clorofila *a* y *b* junto con luteína en las células vegetativas forman del 75 al 80% en

tanto que los carotenoides secundarios como la astaxantina van a conformar del 80 al 99% de astaxantina.³⁹

5.2.4 Requerimientos nutricionales.

El crecimiento de las microalgas es favorecido por nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo mediante mecanismos de absorción. La asimilación es el proceso mediante el cual el nitrógeno inorgánico en forma de nitrato, nitrito y amonio es transformado a nitrógeno orgánico presente en las enzimas, péptidos, proteínas, clorofilas, ADP, ATP, y material genético. El nitrógeno orgánico realiza translocación a través de la membrana plasmática y el nitrato es reducido mediante la enzima nitrato reductasa que usa la forma reducida de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), transfiriendo dos electrones para la conversión a nitrito. Por otro lado, el nitrito es reducido a amonio mediante la enzima nitrito reductasa y la ferredoxina, transfiriendo seis electrones a la reacción y la incorporación final de amonio a los aminoácidos.²⁴

Un factor importante en el metabolismo de las microalgas es el fósforo, pues este se encuentra en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, además de ser intermediarios en el metabolismo de los carbohidratos. Se encuentra disponible para las microalgas en forma de fosfatos como fosfato dihidrógeno (H_2PO_4^-) e hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}). En las microalgas, el fósforo tiene tres procesos de transformación a energía como la fotofosforilación, fosforilación a nivel de sustrato y fosforilación oxidativa.⁴¹ Los micronutrientes y oligoelementos como Fe, Mn, Cu, Mg, Zn y S se requieren en menores cantidades teniendo lugar en las actividades metabólicas y de división celular de las microalgas, siendo necesarios para un óptimo crecimiento, si las células se encuentran en un ambiente adecuado o si realizan procesos de almacenamiento de energía en medios no favorecedores.^{42,43}

5.3 Astaxantina

5.3.1 Generalidades.

Los carotenoides son los pigmentos más abundantes, diversos y de mayor fusión que se encuentran en la naturaleza, abarcando más de 600 pigmentos sintetizados en plantas, algas, hongos, bacterias o musgos. Se caracterizan por ser compuestos lipofílicos de color rojo, naranja o amarillo y cuentan con una estructura principal C40 divididos en dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenoides se ubican en las membranas tilacoidales y tienen la función de absorber la luz y disminuir el exceso de energía en el metabolismo fotosintético. Los carotenoides primarios están ligados con los componentes estructurales y funcionales en el aparato fotosintético celular, mientras que los carotenoides secundarios forman una capa protectora cuando las células se encuentran bajo condiciones de estrés, generando pigmentos de color rojo.^{44, 45}

La astaxantina (C₄₀ H₅₂ O₄, 3,3'-dihidroxi-β, β'-caroteno-4,4'-diona) es el carotenoide implicado en el color rojo o rosa perteneciente a peces como el salmón y la trucha, camarones y crustáceos como langostas y cangrejos⁴⁷. La astaxantina contiene amplias aplicaciones a nivel de industrias farmacéuticas, cosméticas, alimenticias, médicas y nutraceuticas gracias a sus capacidades para eliminar radicales libres, funciones antioxidantes, cardioprotectoras, antidiabéticas y neuroprotectoras. Su influencia en la desintoxicación y función hepática, la disminución de la inflamación como en la enfermedad de Crohn y enfermedad ulcerosa por *Helicobacter pylori*, los efectos fotoprotectores relacionados a la salud ocular y salud de la piel, además de su actividad anticancerígena permite mejorar las tasas de supervivencia y convierte a la astaxantina como un suplemento nutricional benéfico para la salud.^{48, 49, 50, 51}

5.3.2 Estructura química.

La estructura química de la astaxantina (Fig.2), está compuesta por carbono, hidrogeno y átomos de oxígeno, lo que la hace miembro de las xantofilas. El oxígeno puede estar presente como grupos hidroxilo, grupos carbonilo o una combinación de ambas. Además, cuenta con dos anillos terminales se unen por una cadena de polieno. La molécula de astaxantina contiene dos carbonos ubicados en la posiciones 3 y 3' del anillo de β - ionona con un grupo hidroxilo en cada extremo, explicando su capacidad antioxidante y esterificante con ácidos grasos como ácido palmítico, linoleico y oleico.^{52,53, 54}

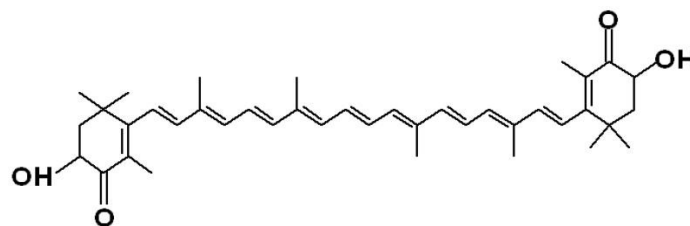


Fig. 2 Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. Planner structure of astaxanthin. 2020. Ambati *et al.* Imagen disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917265/>

La astaxantina se deriva del β - caroteno por 3-hidroxilación y 4-cetolación en ambos grupos terminales de ionona. Estas reacciones son catalizadas por β -caroteno hidroxilasa y β - caroteno cetolasa, respectivamente. La hidroxilación se halla principalmente en las plantas superiores, pero la cetolación solo es restringida a algunas bacterias, hongos y algas verdes unicelulares.^{52, 53}

5.3.3 Síntesis de la astaxantina

La síntesis de astaxantina en la microalga *H. pluvialis* resulta ser un proceso complejo que depende de las condiciones ambientales como la intensidad de luz, nutrientes, entre otros. Como se muestra en la Fig. 3, el isopentil pirofosfato (IPP) es el precursor de la síntesis de carotenoides. Existen dos vías para la biosíntesis de

IPP: la vía del mevalonato (MVA) ubicada en el citosol de células eucariotas y hongos y la vía del no mevalonato (MEP) o también llamada 1- desoxi- D- xilulosa-5- fosfato (DOXP) debido a su formación en la primera etapa de la vía como resultado de la condensación de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato. Este tiene lugar en el cloroplasto de algas verdes, protozoos y plantas superiores.^{55,56}

Mediante análisis transcriptómicos de la biosíntesis de astaxantina, se ha demostrado que en la microalga *H. pluvialis* es más probable que se sintetice este pigmento por la vía DOXP, pues carece de tres enzimas que son necesarias para la vía MVA que cataliza la formación de IPP.⁵⁷

En el proceso de la biosíntesis de astaxantina en los cloroplastos de *H. pluvialis*, el piruvato y gliceraldehído-3-fosfato son la fuente de IPP a través de la vía DOXP. Posteriormente, el IPP se isomeriza a dimetilalil difosfato (DMAPP), mediante la enzima 4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductasa (HDR) que cataliza la interconversión entre IPP y DMAPP^{55,57}. La cadena isoprenoide se elonga con una molécula de DMAPP y la adición de tres moléculas de IPP que son catalizadas por la enzima geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPS). El último paso de ese proceso es la formación de un compuesto C₂₀, pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), un precursor compartido con otros isoprenoide.^{55, 58}

En la síntesis de carotenoides, el primer paso es catalizado por la fitoeno sintasa (PSY) resultando en la formación de fitoeno (C₄₀) mediante la condensación de dos moléculas de GGPP. El fitoeno atraviesa por cuatro pasos de desaturación que son catalizados por dos fitoeno desaturasas (PDS) y una ζ-caroteno desaturasa (ZDS) para convertirse en licopeno. Es importante mencionar que las reacciones de desaturación aumentan el número de dobles enlaces entre carbono - carbono dando origen al cromóforo de los carotenoides.⁵⁹

El licopeno pasa por un proceso de ciclación que es catalizada por dos licopeno ciclasas: LCY-e y LCY-b. En la biosíntesis de carotenoides, este punto de ramificación produce α- caroteno y β- caroteno como precursor de luteína y

astaxantina respectivamente. Las condiciones de estrés en el medio hacen que la mayoría del flujo de carbono sea dirigida hacia la síntesis de β - caroteno y finalmente astaxantina. Los últimos dos pasos de oxigenación catalizados por β - caroteno cetolasa (BKT) y β - caroteno hidroxilasa (CrtR-b) resultan limitantes de la síntesis de astaxantina.⁶⁰ (Fig.3)

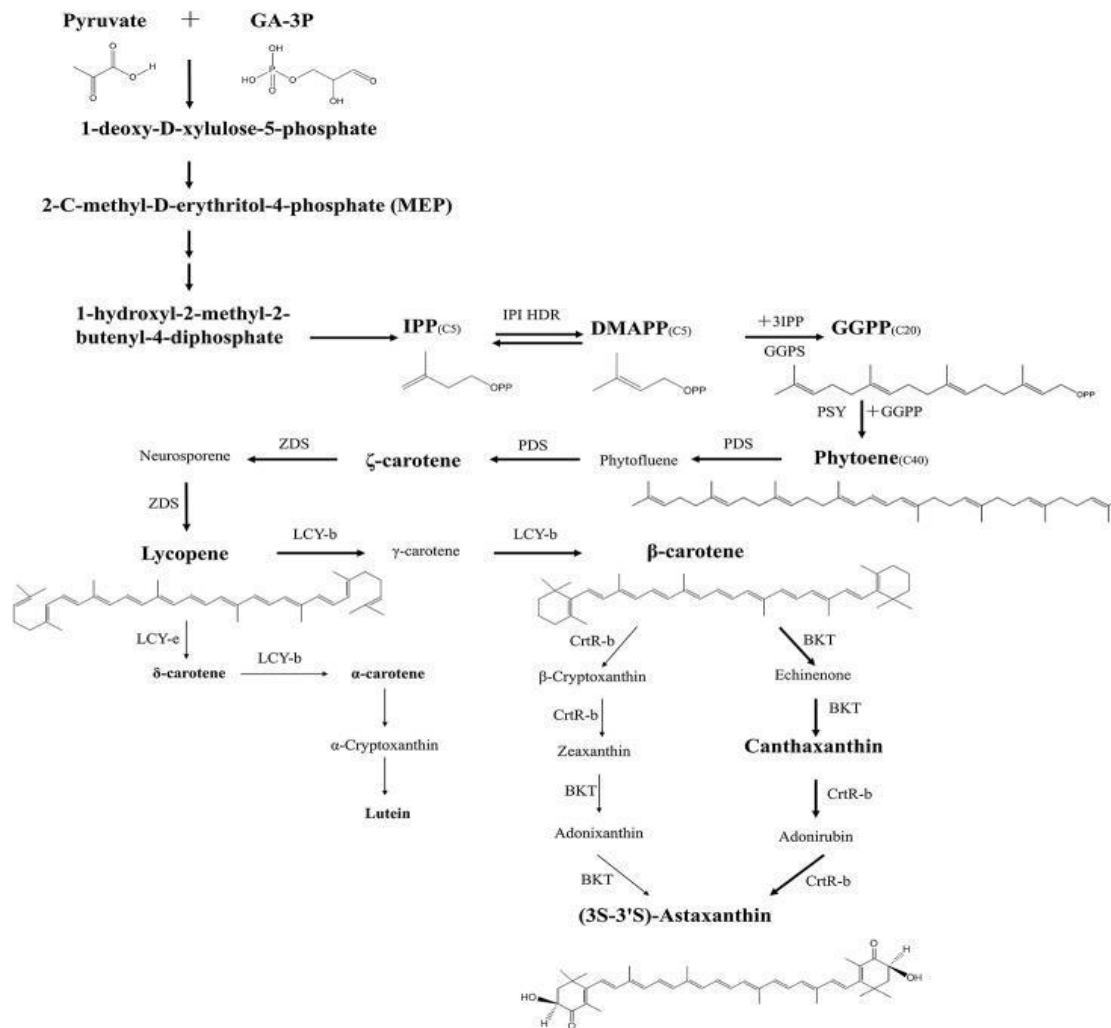


Fig. 3 Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. Pathway of (3S-3'S)-astaxanthin biosynthesis in *H. pluvialis*. 2020. Shah *et. al*. Imagen disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848535/>

5.3.4 Fuentes de astaxantina

La producción de astaxantina ocurre partir de fuentes naturales como subproductos de microalgas, bacterias, levaduras y crustáceos. Las microalgas representan la mayor fuente de astaxantina natural, por lo que las investigaciones van encaminadas al mejoramiento y optimización de los cultivos, así como la implementación de mejores estrategias para su crecimiento, entre otros aspectos. Dentro de las especies de microalgas productoras de astaxantina se encuentran *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella zofingiensis*.⁶¹ Se ha reportado que *Haematococcus pluvialis* tiene la capacidad de acumular la astaxantina hasta un 4% del peso seco, siendo el nivel más alto entre todos los organismos productores que se han conocido.⁶²

Por otro lado, *Corynebacterium glutamicum* es una bacteria Gram positiva de suelo con importancia biotecnológica. Este microorganismo tiene la capacidad de sintetizar aminoácidos para la industria alimenticia y en los últimos años se ha utilizado en el campo de la ingeniería metabólica para ser productora de carotenoides como la astaxantina.⁶³

La astaxantina también puede ser sintetizada por *Paracoccus carotinifaciens*, una bacteria Gram negativa en forma de bastón, que contiene un alto contenido de carotenoides naturales en la ruta biosintética que dirige a la astaxantina, esta última representando del 55% al 60% de los carotenoides totales de las células.^{64,65}

En el grupo de levaduras productoras de astaxantina se encuentra *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Rhodotorula glutinis*, *Candida utilis*, *Rhodospiridium sp*, *Sporobolomyces sp*. Estos microorganismos se consideran adecuados para la producción de carotenoides debido a su facilidad de cultivo, rápido crecimiento y síntesis de metabolitos bajo diferentes sustratos a pesar de que la cantidad de astaxantina producida es menor que en microalgas.^{66,67,68,69}

Los subproductos de los crustáceos como camarones, langostas y cangrejos están compuestos por lípidos, proteínas, sales minerales y pigmentos carotenoides que

pueden estar libres o esterificados con ácidos grasos presentando un contenido entre 119 y 148 $\mu\text{g/g}$.⁴⁴

5.3.5 Usos y aplicaciones de la astaxantina

Los carotenoides presentan una amplia aplicación en la industria de la salud, la belleza y suplementos alimenticios que contienen diversas propiedades medicinales y buscan la prevención de diferentes patologías en humanos y animales.⁷⁰

El efecto neuroprotector de la astaxantina ha sido de interés para su aplicación en prevención y tratamientos de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer y de esclerosis lateral amiotrófica que tienen como característica común el aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células neuronales por agresiones mitocondriales, resultando en muerte celular que conlleva a una neuroinflamación en forma crónica que libera citocinas y quimioninas incrementando el estrés oxidativo generando daño en las neuronas.⁷¹

La astaxantina ha sido evaluada en modelos experimentales de trastornos neurológicos y ha demostrado presentar actividad neuroprotectora en enfermedades neurológicas al estar implicada en efectos antioxidantes ya que tiene la capacidad de eliminar radicales, inhibir la peroxidación lipídica además de poseer el control sobre la expresión génica que se encuentra relacionada con el estrés oxidativo. Sus efectos antiinflamatorios se basan en suprimir los mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF- α e ICAM-1 para mitigar la disfunción neurológica, el edema cerebral y la degeneración neuronal. Por otro lado, su actividad antiapoptótica disminuye el infarto cerebral, la isquemia cerebral y mejora la función neurológica.⁷²

En la infección por *Helicobacter pylori* puede existir una inflamación crónica del estómago dando lugar a gastritis, úlceras pépticas y carcinoma gástrico. Debido a esto, la astaxantina ha sido una opción para inhibir la expresión de IL-8 inducida por *H. pylori*, aminorando el estrés oxidativo a causa de las ROS inducido por la disfunción mitocondrial y la prevención de dicha disfunción contribuye al bloqueo de mediadores inflamatorios como NF-κB. La astaxantina también permite restaurar la catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y superóxido dismutasa que son enzimas antioxidantes.⁷³

La radiación ultravioleta induce en la piel fotoenvejecimiento y daño en el ADN resultando en errores de la reparación conduciendo a mutaciones oncogénicas. Estudios demuestran que la astaxantina en el campo de la dermatología es capaz de reducir el daño del ADN e influir en su reparación y estabilidad. Cabe señalar que el uso de cremas tópicas con astaxantina provenientes de *H. pluvialis* y otros componentes activos presentan reducción de eritema producido por exposición a rayos UV y la inflamación, acompañado de aumento en la elasticidad y humedad de la piel.⁷⁴

El uso de astaxantina en la diabetes mellitus ha demostrado efectos en su prevención y tratamiento. Mediante estudios en modelos murinos, se ha demostrado que la astaxantina reduce significativamente los altos niveles de glucosa en sangre, disminuye la resistencia a la insulina y mejora el metabolismo de la glucosa elevando las reservas de glucógeno en el hígado. Por otro lado, la astaxantina contribuye a la prevención de complicaciones diabéticas como la enfermedad cardiovascular, nefropatía, retinopatía y neuropatía teniendo un papel importante en la progresión de la enfermedad. Por todo lo anterior, la astaxantina por sus efectos antioxidantes es beneficiosa como agente terapéutico para diversas enfermedades sin efectos secundarios ni toxicidad.^{75,76}

5.4 Clorofila

5.4.1 Generalidades

La clorofila es un pigmento verde natural comercialmente importante, responsable de la absorción de energía luminosa y su conversión en energía química a través de la fotosíntesis en organismos como cianobacterias, plantas y algas. Este compuesto bioactivo es ampliamente utilizado en las industrias alimenticias, cosméticas y farmacéuticas. La clorofila se ha consumido para obtener beneficios en la salud como agente nutracéutico con propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antimicrobianas.⁷⁷

La clorofila se presenta en cuatro tipos: clorofila *a* que predomina en la mayoría de organismos con fotosíntesis oxigénica como plantas, cianobacterias y algas. Clorofila *b*, clorofila *d* y *clorofila f*. La exposición de las moléculas de clorofila a oxígeno, ácidos débiles o luz acelera su oxidación generando numerosos productos de degradación.^{78, 79}

5.4.2 Estructura química

La composición química de la clorofila se basa en una estructura básica de porfirina en forma de anillo con una disposición simétrica que consta de tetrapirroles cíclicos necesarios para la fotosíntesis. Cada anillo pirrol contiene cuatro átomos de carbono y un átomo de nitrógeno. Los átomos de nitrógeno forman un halo central en el que un ión metálico Mg^{2+} puede unirse fácilmente.⁸⁰ (Fig.4)

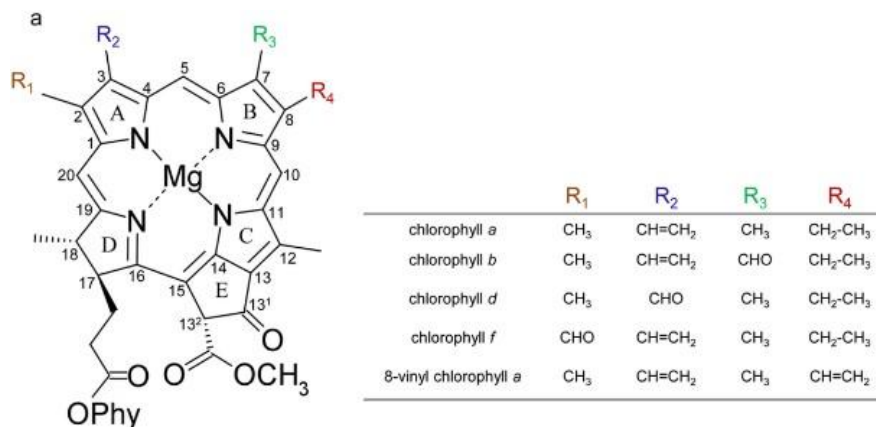


Fig. 4 In vitro Conversion of Vinyl to Formyl Groups in Naturally Occurring Chlorophylls. Structures of naturally occurring chlorophylls. Carbon skeleton atoms are numbered according to the IUPAC system and rings A – E on the macrocycle are indicated.2020. Loughlin *et. al.* Imagen disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep06069>

Las diferencias estructurales en la clorofila *a* y *b*, *d* y *f* resulta en que el grupo metilo de la clorofila *a* es reemplazado por un grupo formilo para la formación la clorofila *b*, *d* y *f* en las posiciones C7, C3 y C2 respectivamente. Por lo tanto, la clorofila *a* se caracteriza por tener un pigmento azul - verde con una absorbancia de 660 a 665 nm, la clorofila *b* de verde- amarillo con absorbancia de 642 a 652 nm y las clorofilas *d* y *f* pueden hacer uso de la luz con longitudes de onda superiores a 700nm.^{80,81}

5.4.3 Síntesis de clorofilas

La síntesis de clorofilas ocurre en los cloroplastos y toma la ruta de reacción de la enzima clorofila *a* oxigenasa (CAO). Para la reacción de la enzima es probable que se transfiera un electrón desde el centro de Rieske a un hierro mononuclear para posteriormente activar el oxígeno molecular para la oxigenación del grupo metilo de la clorofila *a*.⁸² La síntesis de clorofila *b* ocurre a partir de la clorofila *a*, mediante la enzima CAO que cataliza dos hidroxilaciones en la posición C7 de la clorofila *a*, dando lugar a un aldehído que forma un grupo formilo para producir clorofila *b*.⁷⁹

En cuanto a la síntesis de clorofila *d* es posible que se sintetice a partir de la clorofila *a*, mediante la enzima de tipo P450 que realiza un proceso de oxidación para la conversión del grupo 3- vinilo de clorofila *a* en un grupo 3- formilo en la clorofila *d*.⁸³ En la síntesis de la clorofila *f*, se ha reportado que depende de la síntesis de 2-formilclorinas en el que un grupo metilo en la posición 2 del metil mesopiroforbido es transformado en un grupo 2- formilo para dar lugar a un análogo de la clorofila *f*.⁸⁴

5.4.4 Fuentes de clorofila

Los colorantes alimentarios naturales usados tradicionalmente han sido las futas y las verduras pero debido a la naturaleza fotoautótrofa de las microalgas, estas representan una gran fuente de moléculas biológicas activas, entre ellas los pigmentos como la clorofila *a*. Las diatomeas contienen clorofila *a* y *c* junto con carotenoides que les confiere mayor fotoprotección ante condiciones de estrés como alta irradiación, salinidad y limitación de nitrógeno. Dentro del grupo de microalgas, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella protothecoides*, *Haematococcus pluvialis*, *Dunaliella salina*, *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis sp*, *Chlorococcum sp* y *Scenedesmus sp*, contienen clorofila *a* y *b* y se consideran fuentes importantes para la industria farmacéutica y en la conformación de suplementos nutricionales.^{85, 86,87}

Las cianobacterias son microorganismos fotoautótrofos con capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica similar a las plantas que producen una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos como la clorofila. Están ampliamente distribuidas en fuentes de agua dulce y agua de mar, además de ambientes terrestres siendo funcionales para el tratamiento de patologías. La cianobacteria *Acaryochloris marina* se caracteriza porque reemplaza la clorofila *a* en clorofila *d* en sus fotosistemas y *Halomicronema hongdechloris* puede acumular clorofila *f* y algunas veces clorofila *d* cuando esta es cultivada bajo luz roja, mientras que en luz blanca su fotopigmento principal es la clorofila *a*.^{88,89,90}

5.4.5 Usos y aplicaciones de la clorofila

La clorofila es el pigmento más abundante en el mundo y se ha documentado que tiene múltiples aplicaciones anticancerígenas, antioxidantes y antienvjecimiento.⁶⁰ Derivados de la clorofila como la feofitina, pirofeofitina y el feoforbido tienen actividad citotóxica contra células tumorales de mieloma y hepatoma.⁹¹ También tiene la capacidad de inhibir la hiperproliferación inducida por el hemo consumido en la dieta en las células epiteliales del colon, debido a la presencia de un metabolito del hemo (factor hemo) soluble en lípidos con características citotóxicas. El factor hemo altera el recambio celular normal en el epitelio, aumenta las mutaciones y por ende el riesgo de cáncer de colon.⁹²

La exposición a radiación ultravioleta, productos químicos o agentes físicos producen efectos adversos dentro de las células como el daño en el ADN, inflamación y envejecimiento de la piel. Los compuestos bioactivos de las microalgas tales como la clorofila, se han implementado en las formulaciones de la industria cosmética y dermatológica por su actividad antienvjecimiento, antipigmentación y anticancerígena a la vez que causa menos afectación que los compuestos sintéticos de los productos. Sin embargo, es un área en la que los mecanismos de acción para el cumplimiento de dichas funciones no se han estudiado completamente, lo que resulta importante para mejorar la calidad de cada cosmético.^{93, 94}

Finalmente, se ha descrito la actividad antimicrobiana de catabolitos de la clorofila *a* como el feoforbido *a* basándose en la inhibición de las bombas de eflujo como NorA, Mef (A), de bacterias como *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y algunas anaerobias.⁹⁵

5.5 Técnicas de extracción de astaxantina y clorofila

La extracción y cuantificación de la astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis* tiene varios procesos. Sin embargo, la naturaleza de los carotenoides por su conjugación de dobles enlaces en sus moléculas, son susceptibles a la descomposición por acción del aire ya que el oxígeno favorece la oxigenación de los dobles enlaces a funciones como hidroxilos o peróxidos. La temperatura da lugar a reacción de degradación y la luz puede cambiar la estructura de los carotenoides dando paso a reacciones fotoquímicas.

Los carotenoides obtenidos se deben separar y analizar por métodos como cromatografía en capa fina, columna, espectrofotometría y cromatografía líquida de alta eficiencia. Los dos últimos métodos son los aplicados en este ensayo y en los cuales se hace énfasis.⁹⁶

5.5.1 Espectrofotometría UV- VIS

La espectrofotometría UV-VIS es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Su fundamento se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiaciones dentro del espectro UV visible y la longitud de onda de las radiaciones que una molécula absorba y su eficiencia dependen de la estructura atómica y las condiciones ambientales. La región UV es el rango de longitudes de onda entre 195 y 400 nm donde compuestos con doble y triple enlace, grupos carbonilo y sistemas aromáticos tienen su máxima absorbancia; mientras que la región visible corresponde a la longitud de onda que se transmite de 400- 800 nm.⁹⁷

La ley de Lambert-Beer expresa la relación entre absorbancia de luz monocromática de longitud de onda fija y concentración de un cromóforo en solución. La absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración y depende de la distancia que recorre la luz por la muestra y de ϵ denominado

constante de extinción, específica de cada cromóforo siendo una constante de proporcionalidad.⁹⁷

5.5.1.1 Espectrofotómetro

El espectrofotómetro UV- visible realiza la medición de absorbancia de luz por las moléculas y están conformados por los siguientes componentes:

- Fuente de energía radiante: lámparas de tungsteno o tungsteno halógeno que provee una radiación continua adecuada del espectro visible al infrarrojo cercano.
- Selector de longitud: parte de la radiación emitida por la fuente es colectada y dirigida al selector de longitud de onda o a la muestra.
- Compartimiento de la muestra: es un espacio ajustado a la luz con una tapa de seguridad y que contiene una o más celdas de vidrio, cuarzo o plástico transparente con la muestra. La radiación transmitida por el selector de longitud es dirigida a la celda que contiene la muestra.
- Detectores: son fototubos de vacío, detectores fotónicos, fotomultiplicadores, fotodiodos y sistemas de transferencia de carga son utilizados como detectores en espectrofotómetros de amplio espectro.
- Procesamiento de la señal y lectura: el detector genera una señal que contiene información sobre el poder de radiación transmitido por una solución de muestras. Esta señal es procesada por un software para extraer la

información requerida y presentarla en un dispositivo de lectura que puede ser un medidor digital, impresora, cámara o combinación de estos.

Las condiciones en solución son un factor importante ya que la naturaleza de los analitos influye en la determinación de la concentración, la sensibilidad de la calibración, precisión, exactitud, límite de detección y linealidad. El solvente, el valor de pH y la temperatura deben ser optimizados para prevenir la descomposición por oxidación o fotodescomposición.⁹⁷

5.5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), es un método físico de separación y cuantificación que se basa en la distribución de los componentes de una mezcla entre una fase estacionaria y una fase móvil que fluye permanentemente durante el análisis. La cromatografía líquida se realiza en una columna de vidrio en donde se deposita la muestra en la parte superior y fluye a la fase móvil a través de la columna por gravedad. Las interacciones hidrofóbicas, dipolares, electrostáticas o puentes de hidrogeno aparecen cuando la muestra y la fase móvil son forzadas a travesar la fase estacionaria. El tamaño de las partículas de la fase fija disminuye y usa altas presiones para lograr que la fase móvil pueda fluir.^{98, 99}

Esta técnica posee grandes ventajas por su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, puede trabajarse a bajas temperaturas en ausencia de luz y aire permitiendo la cuantificación de los productos y caracterización de los carotenos presentes.^{96, 98}

5.5.2.1 Cromatógrafo líquido

Un cromatógrafo líquido es un equipo necesario para la realización de HPLC y está constituido por los siguientes componentes: (Fig. 5)

- Reservorio de solvente que alimenta el sistema con la fase móvil: el cromatógrafo de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio que contienen disolvente que puede ser agua, disoluciones tampón o disolventes orgánicos como metanol. Estos tienen la capacidad de eliminar mediante filtros, gases disueltos como el oxígeno y otras partículas de polvo que pueden interferir formando burbujas en los sistemas de detección.
- Sistema de bombeo: tiene la función de impulsar la fase móvil del reservorio de solvente hasta el inyector y posteriormente a la columna. Las bombas están constituidas por materiales como el acero inoxidable, resistente a los químicos y el desgaste mecánico.
- Inyector: dispositivo que introduce la muestra en solución sin interrumpir el caudal del solvente a través del sistema. Los bucles de muestra son dispositivos que integrados al equipo puede permitir la elección de medida de la muestra.
- Columnas para cromatografía: están constituidas por acero inoxidable de longitud entre 5 a 30 cm y diámetro de 1 a 5 mm. En las columnas se genera la de velocidad diferencial de los solutos que permite su separación.
- Detector: su función es indicar los momentos de aparición de los componentes, además de proporcionar una indicación cuantitativa y cualitativa de los mismos. Pueden ser de dos tipos: detectores basados en una propiedad de la disolución que responde a una propiedad de la fase móvil

como el índice de refracción o densidad que puede ser modificada por la presencia del analito. El segundo tipo son los detectores basados en una propiedad del soluto, los cuales responden a la absorbancia UV o fluorescencia del soluto que no son de la fase móvil.

- Procesamiento de datos: el registro de la obtención de fracciones separadas de los componentes de las muestras y el cromatograma provienen del detector mediante un sistema de toma y procesamiento de datos como el registrador gráfico que convierte la señal en un gráfico y en el integrador que además del cromatograma, también presenta el tratamiento matemático para obtener las concentraciones. La interfase convierte la señal analógica del detector a señal digital en un ordenador, donde estos datos pueden ser manipulados y almacenados mediante un software apropiado.^{98, 100}

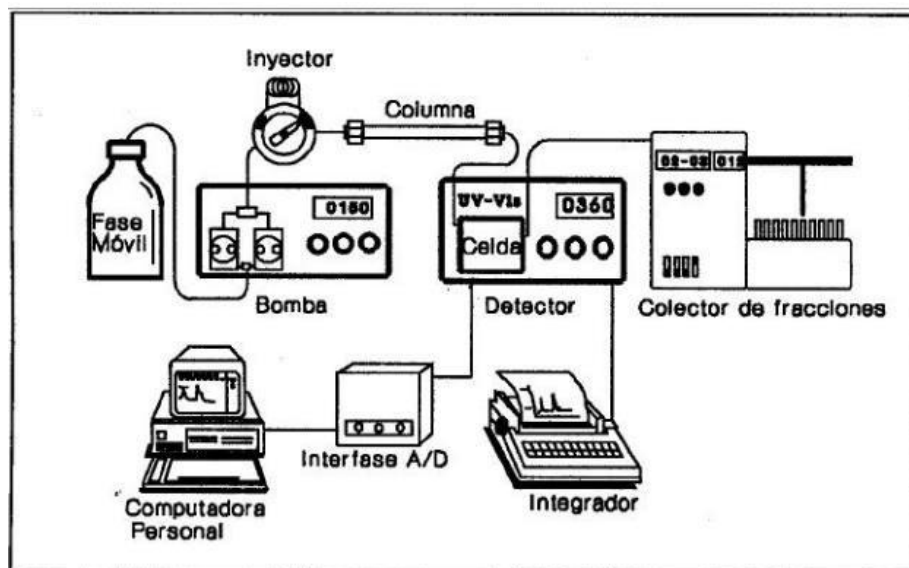


Fig. 5 Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Esquema de general de un Cromatógrafo líquido. 2020. Quattrocchi *et al.* Imagen disponible en: <https://doku.pub/documents/introduccion-a-la-hplc-aplicacion-y-practica-o-a-quattrocchi-s-a-de-andrizzi-r-f-laba-5lwod9wy4eqj>

6. Metodología

6.1 Tipo de investigación

La investigación realizada en este proyecto es de carácter mixta, ya que abarca un proceso investigativo cualitativo y cuantitativo.

6.2 Alcance de la investigación

El alcance de la investigación realizada se caracteriza por ser de tipo exploratorio, explicativo y descriptivo.

6.3 Población objeto de estudio

La población objeto de estudio son las aguas residuales como medio de cultivo para *Haematococcus pluvialis*.

6.4 Muestra

La muestra del trabajo de investigación son aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas.

6.5 Variables

6.5.1 Variable independiente.

La variable independiente abarca las cepas UA y UTEX 2505 de *H. pluvialis* y los medios de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas para el crecimiento de *H. pluvialis*.

6.5.2 Variable dependiente.

La variable dependiente abarca el crecimiento celular de *H. pluvialis* y la producción de astaxantina.

6.6 Indicadores

- Composición de las aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas.
- Concentración de nutrientes en el medio para *H. pluvialis*.
- Condiciones ambientales del medio de cultivo para *H. pluvialis* en fase de crecimiento.
- Condiciones ambientales del medio de cultivo para *H. pluvialis* para la producción de astaxantina.
- Privación de nutrientes en el medio.

6.7 Método utilizado

6.7.1 Técnicas y procedimientos.

La definición de la metodología se realizó mediante una revisión bibliográfica teniendo en cuenta los medios de cultivo a utilizar, las condiciones determinantes de

crecimiento y estrés celular como fotoperiodo, temperatura, agitación, entre otros. (Datos no mostrados).

6.7.2 Microorganismo.

La microalga *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505, cepa de referencia (colección de cultivos de algas) suministrada por la facultad de ingeniería de la Universidad de la Sabana y la cepa UA (Universidad de Antioquia) suministrada por la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

6.7.3 Preparación de preinóculo.

La preparación del preinóculo se realizó a partir de las cepas de referencia, adicionando 120 mL de medio de cultivo Volvox estéril y 13,5 mL de cada cepa en frascos de vidrio de 500 mL a pH de 6.8, agitación manual una vez al día, fotoperiodo de 18 horas luz con lámparas de luz blanca y 6 horas oscuridad, temperatura ambiente por 21 días (Fig. 6)

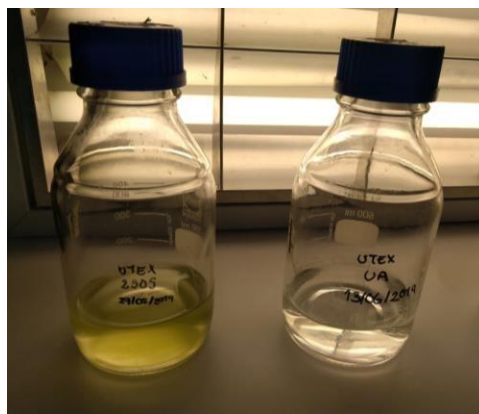


Fig. 6 Medio volvox con preinóculo de UTEX 2505 y UA de *Haematococcus pluvialis*. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

El preinóculo fue monitoreado mediante observación de morfología, color y conteo celular en cámara de Neubauer, logrando una concentración celular de 74×10^4 células/mL para UTEX 2505 y 12×10^4 células/mL para UA de *H. pluvialis*. Según la concentración celular de cada cepa, se estableció mediante la fórmula: $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ el volumen del inóculo para alcanzar una concentración de 1×10^4 en los medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina.

6.7.4 Muestras de agua residual.

La muestra de agua residual doméstica fue tomada en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas del municipio de Bojacá, Cundinamarca. La muestra de agua residual porcina se obtuvo de un criadero de porcinos ubicado en el municipio de Facatativá, Cundinamarca.

6.7.5 Medios de cultivo.

La suspensión de agua residual doméstica y agua residual porcina se filtró y diluyó con agua destilada para obtener 2 medios líquidos de crecimiento final de 75 mL que contenían 12,5% de suspensión filtrada en frascos de vidrio.

Los cultivos se inocularon a una concentración de biomasa inicial de 1×10^4 células/ml de la cepa UTEX 2505 y UA de *H. pluvialis* en medio con agua residual doméstica y medio con agua residual porcina cada una. Cada tratamiento se hizo por triplicado.

6.7.6 Condiciones ambientales en fase de crecimiento celular.

Las condiciones establecidas para la fase de crecimiento de *H. pluvialis* se establecieron con fotoperiodo para los cultivos con ciclo de luz/oscuridad de 18:6 h con lámparas de luz blanca a 689 luxes. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente por un lapso de tiempo de 29 días. La mezcla fue proporcionada por agitación manual diariamente.

6.7.7 Conteo celular.

El conteo celular de *H. pluvialis* se realizó por triplicado para cada medio de cultivo en cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 con agua destilada de acuerdo a la concentración celular de cada medio.

6.7.8 Condiciones ambientales para la producción de astaxantina.

Para la producción de astaxantina se determinó un fotoperiodo para los cultivos con ciclo de luz/oscuridad de 20:4 h con lámparas de luz blanca en promedio a 22.512 luxes. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente por un lapso de tiempo de 20 días. La mezcla fue proporcionada por agitación manual diariamente.

6.7.9 Extracción de clorofila y astaxantina.

Para la extracción de clorofila y astaxantina se usó el método APHA (1992) de extracción de metanol al 90% tomando 1 mL de muestra, la cual se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se retiró el sobrenadante (medio de cultivo); y al paquete celular se le adicionó 1 mL de metanol al 90% y se calentó en baño serológico durante 10 minutos a 60°C para posteriormente centrifugar a 12.000 rpm por 5 minutos.

La concentración de astaxantina por HPLC se determinó según Yuan y Chen (1999) modificado, en donde se cambió el metanol por acetona al 100%, el procedimiento se desarrolló de la siguiente manera: se tomó una alícuota de 5 ml de la suspensión de células de microalga y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min para concentrar la biomasa. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 ml de acetona y se mezcló con 0,40 g de partículas esféricas (tamaño de partícula = 0,2-1 mm), se mezcló vigorosamente en vórtex durante 15 minutos y nuevamente se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. Finalmente, el sobrenadante se mezcló con 0,1 ml de una solución de NaOH en metanol (5 mM) y se mantuvo durante la noche en oscuridad a

70 °C en estufa de secado con aire recirculante para saponificar los enlaces de astaxantina.

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron: columna cromatográfica C18, de 4.6 x 100 mm y 5 µm de tamaño de partícula, se evaluó una temperatura isocrática entre 25 y 30°C, utilizando como fase móvil metanol:agua:hexano (95%/4%/1%), flujo entre 0,5 y 1 mL/min, volumen de inyección entre 10 y 20 µL y longitud de onda entre 480 y 488 nm.

6.7.10 Cuantificación de clorofila y astaxantina.

La cuantificación de clorofila y astaxantina de todos los medios de cultivo se obtuvieron por medio de la técnica de espectrofotometría y las muestras del último día del ensayo bajo estrés celular también fueron evaluadas para determinar la concentración de astaxantina mediante HPLC.

6.7.11 Cambios morfológicos.

Los cambios morfológicos de *H. pluvialis* se tomaron mediante registro fotográfico durante la fase de crecimiento y de estrés celular.

6.7.12 Control de calidad.

Los experimentos se realizaron por triplicado con medio RM como control positivo y control negativo.

6.8 Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores (medios de cultivo y cepas) con varias muestras por grupo para los dos tratamientos por triplicado con un nivel de confianza del 95%, empleando para el análisis Excel 2010.

7. Resultados

7.1 Fase de crecimiento celular

Se evaluó el crecimiento de las cepas UTEX 2505 y UA de *Haematococcus pluvialis* en medios de cultivos a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas al 12.5% cada uno durante 29 días bajo las condiciones de fotoperiodo luz/oscuridad 18:6 h con lámparas de luz blanca, temperatura ambiente y agitación manual.

7.1.1 Medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12.5% para *Haematococcus pluvialis* durante la fase de crecimiento.

En el registro fotográfico a los medios de cultivo durante la fase de crecimiento celular se logra observar los cambios representativos de pigmentación de color amarillo turbio a color verde durante los días 8, 15 y 29. (Fig. 7, 8,9)



Fig. 7 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 8. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

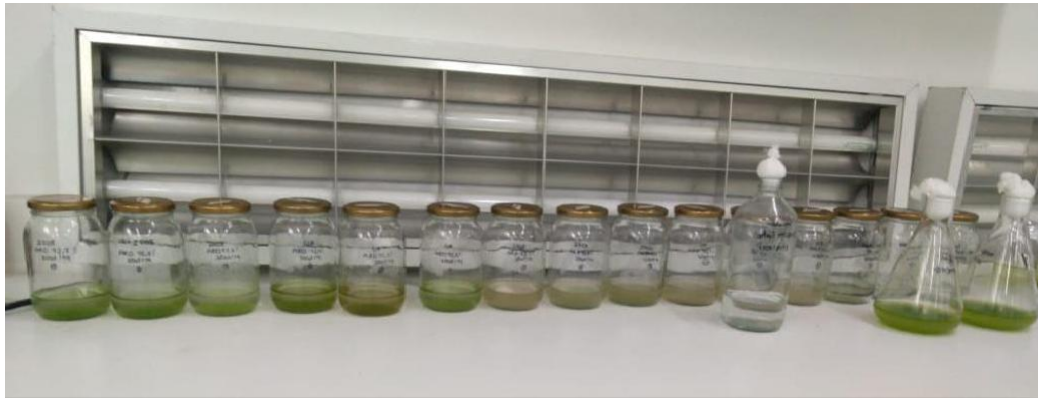


Fig. 8 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 15. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

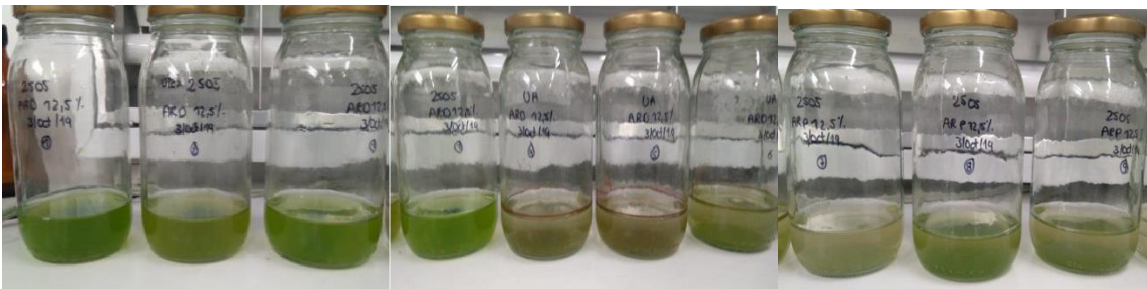
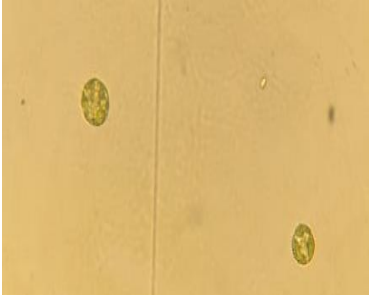
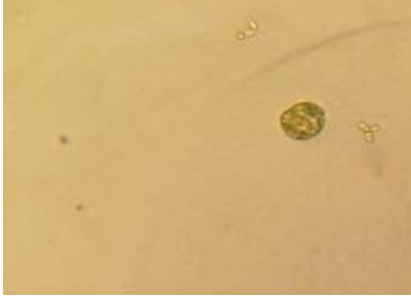


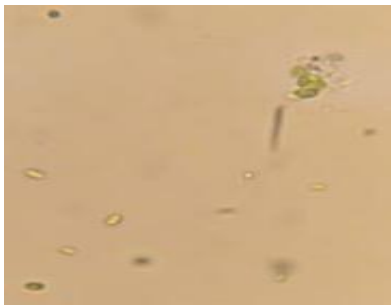
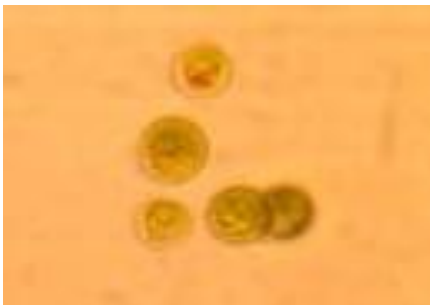
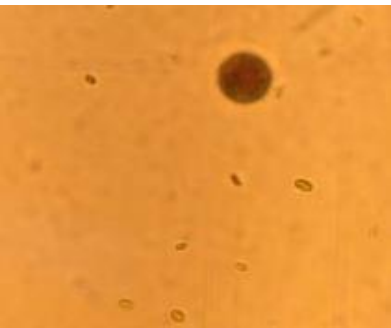
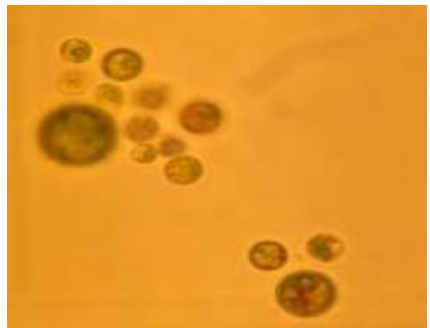


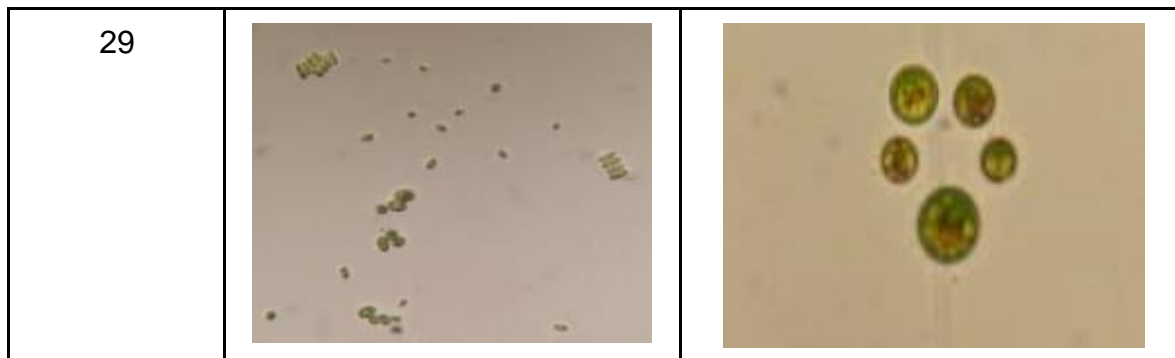
Fig. 9 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P día 29. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

7.1.2 Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de crecimiento.

En la tabla 1 se evidencian los cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA de *H. pluvialis* en medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas al 12.5%. La cepa UTEX 2505 en desde el día 0 hasta el día 29 del ensayo demuestra macrozooides en forma esférica y elipsoidal las cuales predominan en condiciones de cultivo favorables. Por otro lado, la cepa UA en el día 0 cuenta con macrozooides, el día 8 demuestra células flageladas y desde el día 15 al 29 palmelas y células intermedias.

Tabla 1. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas




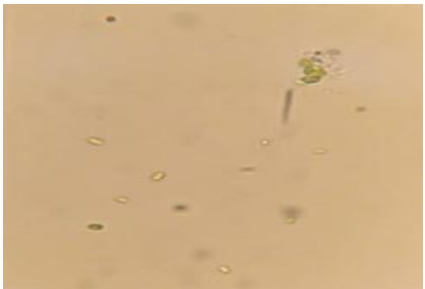
| Día | UTEX 2505 | UA |
|-----|---|--|
| 0 |  |  |
| 8 |  |  |
| 15 |  |  |
| 22 |  |  |

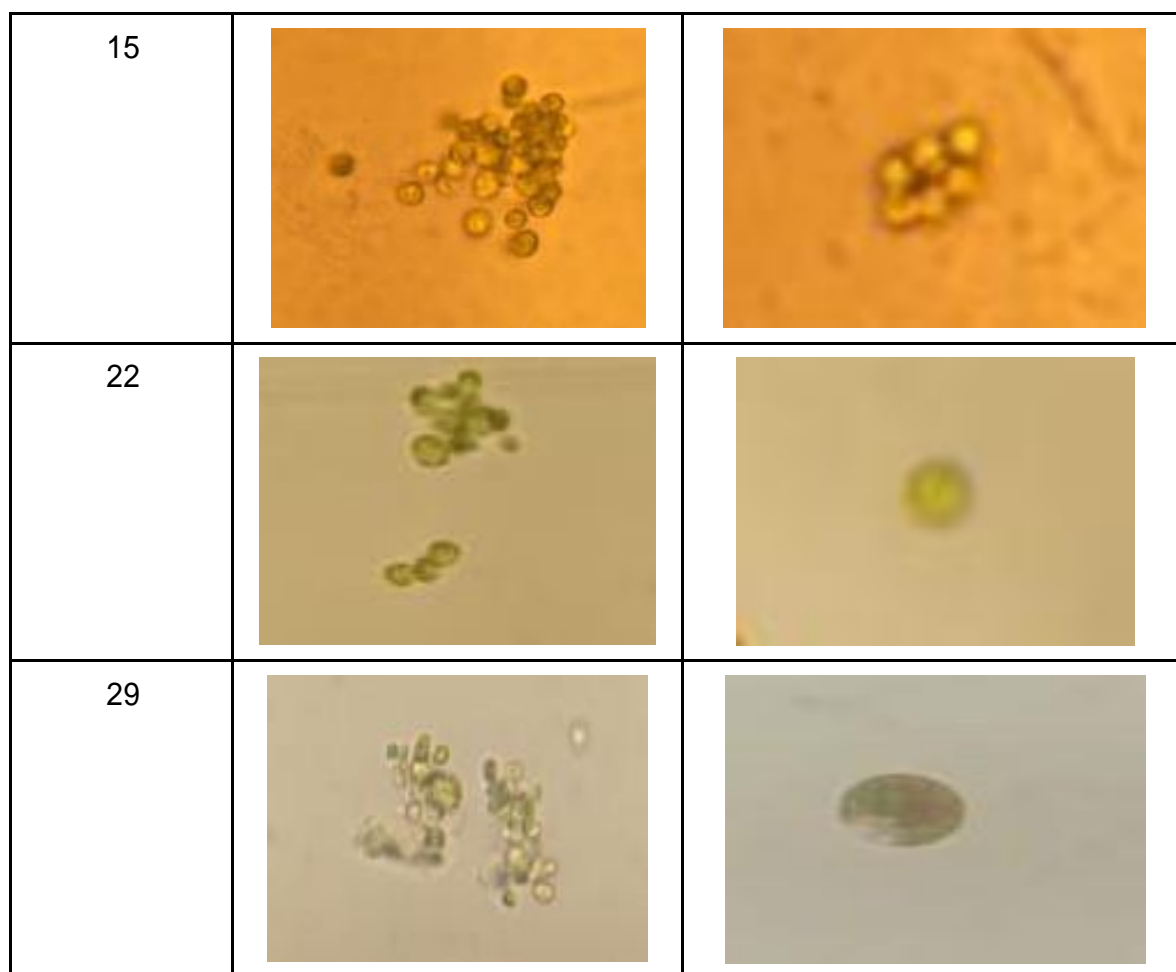


Nota: construcción propia, Quintero E. 2019.

Los cambios morfológicos de *H. pluvialis* en medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas al 12.5% se muestran en la tabla 2. La cepa UTEX 2505 y UA desde el día 0 hasta el día 29 del ensayo presentaron macrozooides.

Tabla 2. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas.

| Día | UTEX 2505 | UA |
|-----|---|--|
| 0 |  |  |
| 8 |  |  |



Nota: construcción propia, Quintero E. 2019.

7.1.3 Cinética de crecimiento.

Los datos de crecimiento se obtuvieron mediante recuento en cámara de Neubauer con los cuales se realizó la cinética de crecimiento celular. Se determinó que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas a concentración de 12,5% presentó mayor tasa de crecimiento celular con la cepa UTEX 2505, obteniendo una concentración celular de 3409×10^4 células/mL al día 22. En medio con agua residual porcina, la cepa UTEX 2505 alcanzó una concentración celular máxima de $620,66 \times 10^4$ células/mL en el día 29, mientras que el control tuvo una concentración celular máxima de 187×10^4 células/mL en el día 15. (Fig.10)

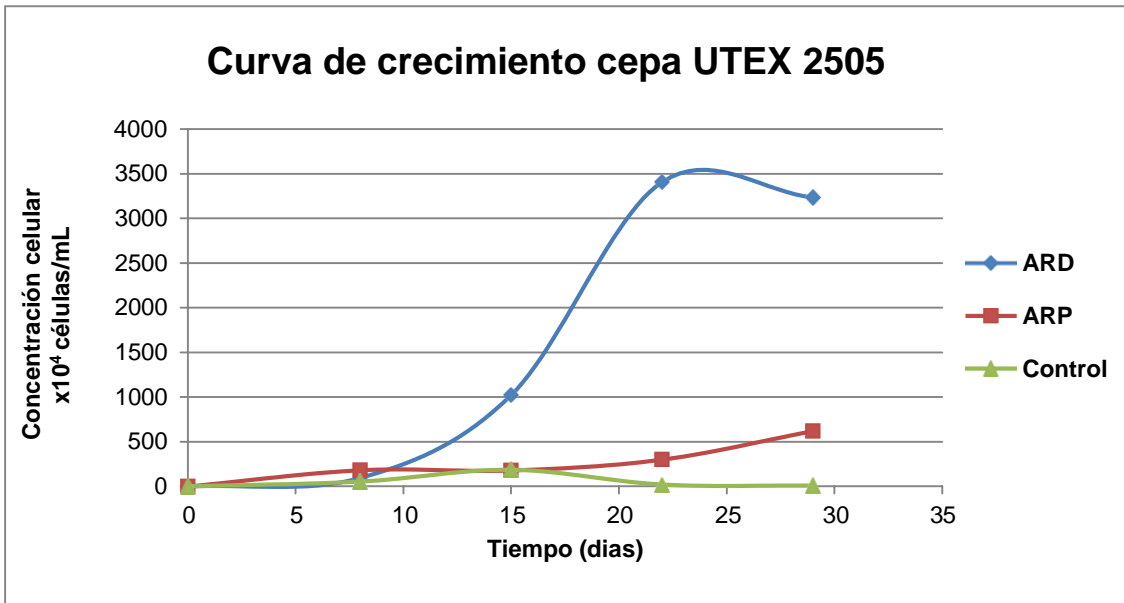


Fig. 10 Curva de crecimiento de la cepa UTEX 2505 de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5%. Construcción propia, Quintero E. 2019

El medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas no generó crecimiento significativo con la cepa UA de *Haematococcus pluvialis*. Se evidenció que la cepa obtuvo una concentración celular máxima de $32,08 \times 10^4$ células/mL en medio con agua residual doméstica en el día 22 y el control demostró un crecimiento máximo de $24,62 \times 10^4$ células/mL en el día 22. (Fig.11)

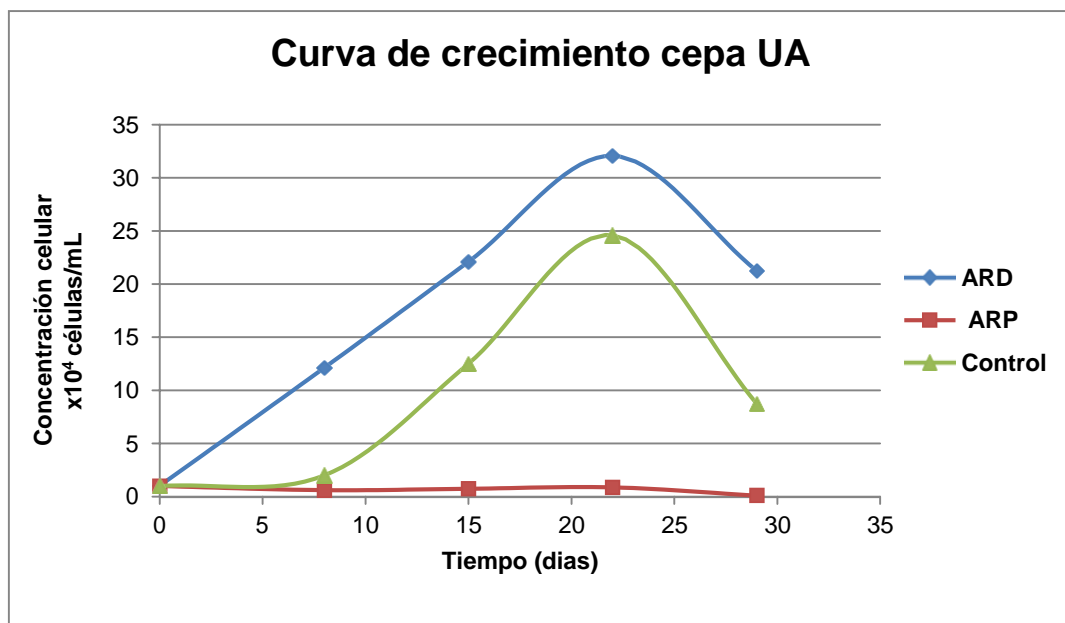


Fig. 11 Curva de crecimiento de la cepa UA de *H. pluvialis* en medio de agua residual doméstica y

Para cada medio de cultivo y cepa de *H. pluvialis* se realizó un ajuste de crecimiento celular según el modelo logístico utilizando el software DMfit basado en el modelo de Baranyi y Roberts (1994), transformando los valores de Y a los cuales se realizó el cálculo del logaritmo en base 10 para obtener Log vs Tiempo del crecimiento celular. Este ajuste tuvo como objetivo determinar si habían diferencias significativas en la velocidad de crecimiento de *H. pluvialis* en los medios de cultivo a partir de aguas residuales. El medio de cultivo a partir de agua residual porcina con la cepa UTEX 2505 tuvo la mayor velocidad de crecimiento con 0,030 células/ día. (Tabla 3) (Anexo 1 ajuste de curvas).

Tabla 3. Matriz de coeficientes del modelo logístico ajustado para los medios de cultivos y cepas de *H. pluvialis* evaluadas.

| Medios de cultivo y cepas | No. datos | Dato mínimo | Dato máximo | Velocidad de crecimiento | Coeficiente de determinación |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-------------|--------------------------|------------------------------|
| Agua residual doméstica – UTEX 2505 | 5 | 4 | 7,532 | 0,029 | 85% |
| Agua residual doméstica – UA | 5 | 4 | 5,506 | 0,023 | 68% |
| Agua residual porcina – UTEX 2505 | 5 | 4 | 6,792 | 0,030 | 87% |
| Agua residual porcina - UA | 5 | 3,079 | 4 | 0,016 | 49% |

Nota: construcción propia, Quintero E. 2020

En este estudio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (medios de cultivo y cepas de *H. pluvialis*) con varias muestras por grupo para el crecimiento de *H. pluvialis*. Se demostró que para una confianza del 95% existen diferencias estadísticamente significativas ($P= 0,05$) entre las medias de crecimiento de las cepas de *H. pluvialis*., pero no hay diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo evaluados. (Anexo 2)

7.2 Fase de estrés celular

La fase de estrés celular de *H. pluvialis* en los medios de cultivo evaluados, se realizó durante cuatros semanas posteriores a la fase de crecimiento con fotoperiodo luz/ oscuridad 20:4 h con lámparas de luz blanca, temperatura ambiente y agitación manual.

7.2.1 Medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12.5% para *Haematococcus pluvialis* durante la fase de estrés celular.

Los cambios macroscópicos de los medios de cultivo fueron registrados mediante fotografías, observando variaciones en el color verde de los medios a partir de la semana 1 de estrés a color rojo durante las semanas 2, 3 y 4. (Fig. 12, 13, 14,15)



Fig. 12 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 1 de estrés celular. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

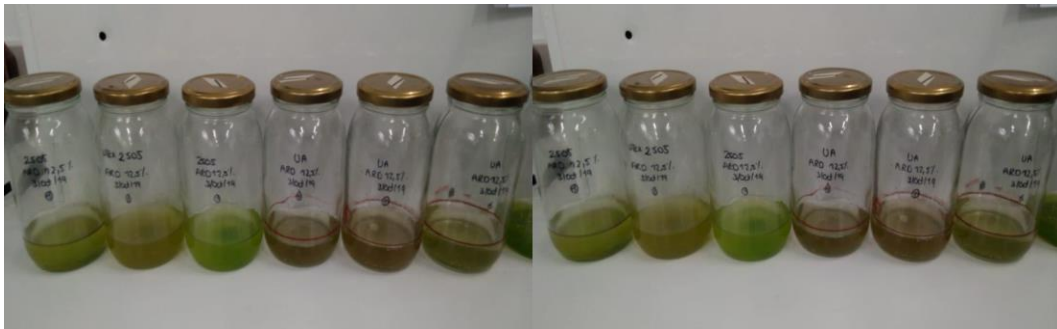


Fig. 13 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 2 de estrés celular. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.



Fig. 14 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 3 de estrés celular. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

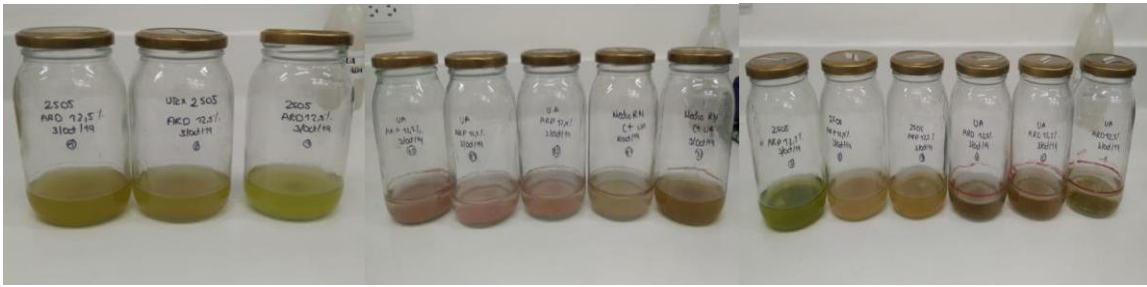
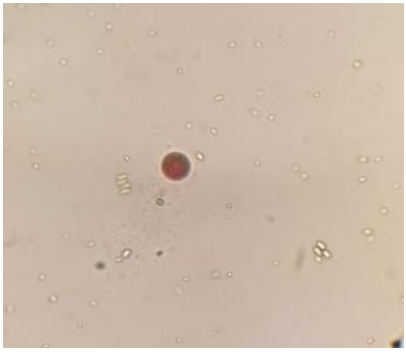
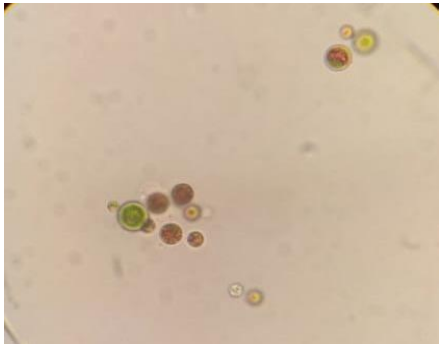


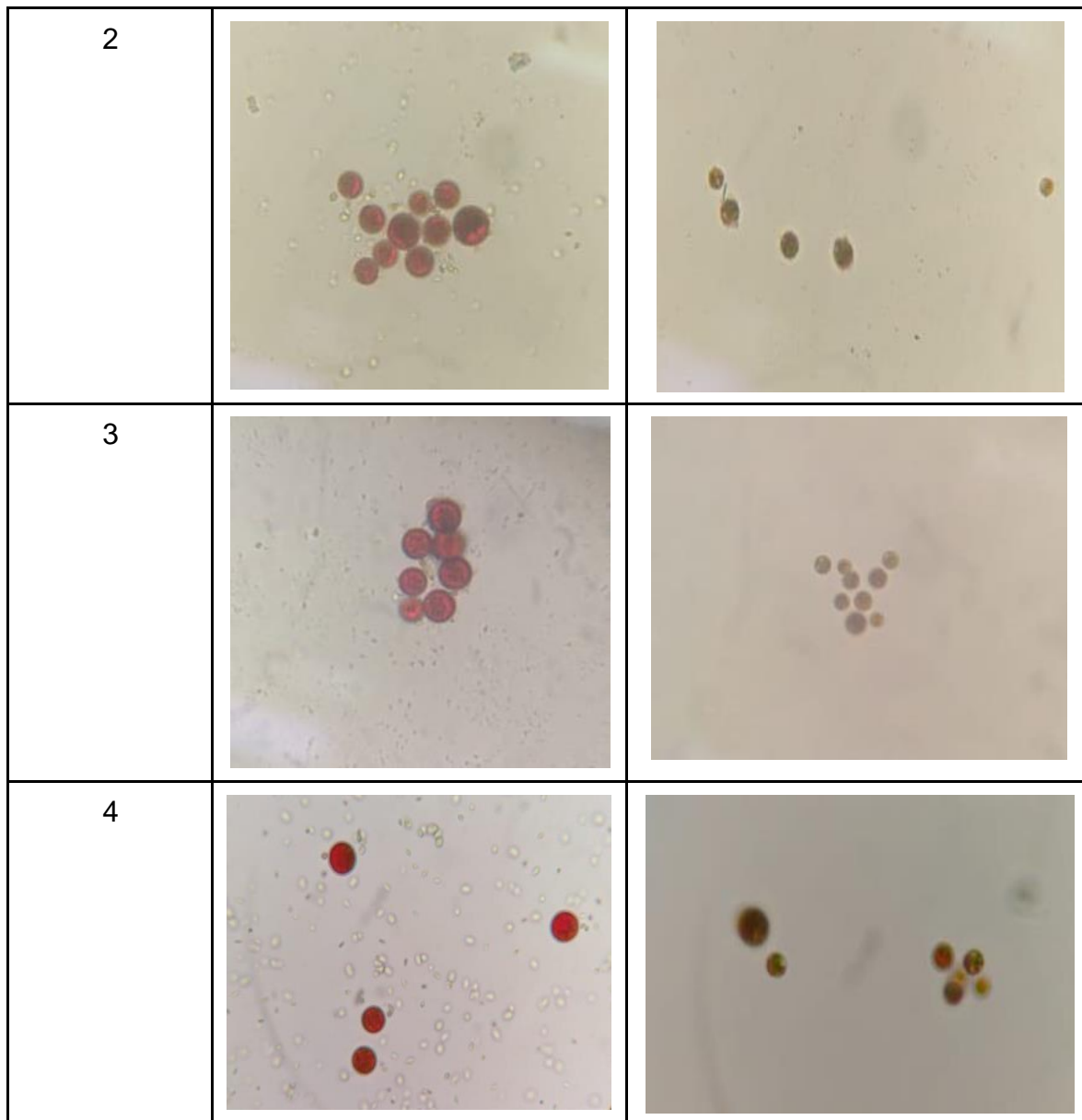
Fig. 15 Medios de cultivo A.R.D y A.R.P semana 4 de estrés celular. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2019.

7.2.2 Cambios morfológicos de *Haematococcus pluvialis* en los medios de cultivo durante la fase de estrés celular.

La tabla 4 presenta la morfología celular de *H. pluvialis* en medio a partir de aguas residuales domésticas. La cepa UTEX 2505 presenta aplanosporas y palmelas, mientras que con la cepa UA se evidencian células intermedias y aplanosporas.

Tabla 4. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales domésticas.

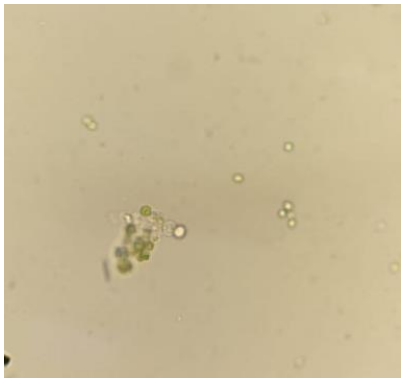
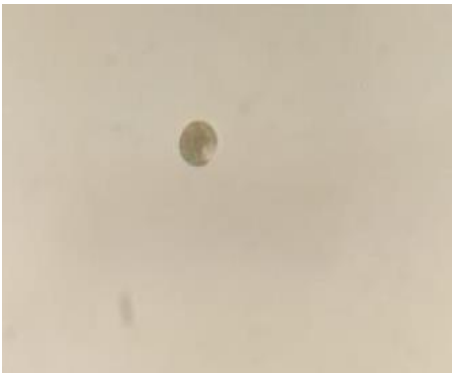
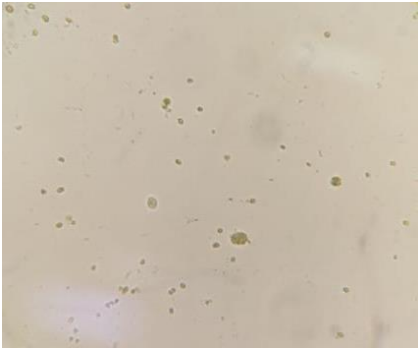
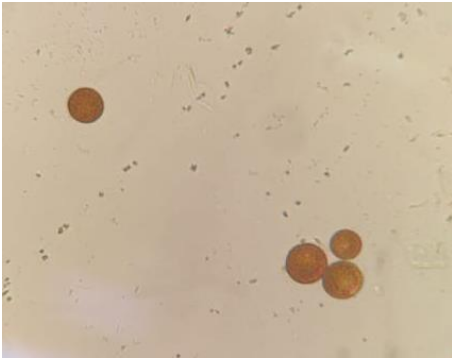
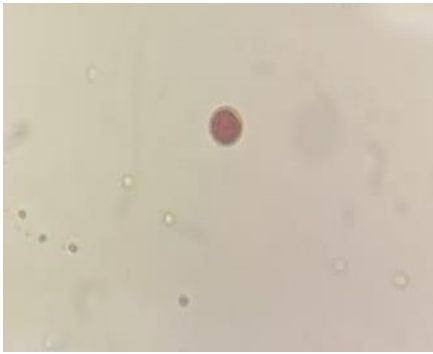
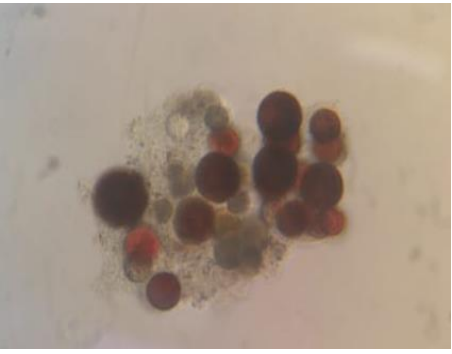
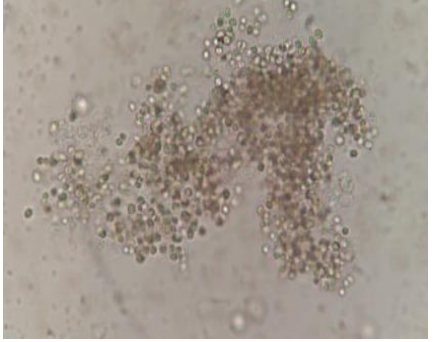

| Semana | UTEX 2505 | UA |
|--------|---|--|
| 1 |  |  |



Nota: construcción propia, Quintero E. 2019.

La tabla 5 demuestra la morfología de *H. pluvialis* en medio de cultivo a partir de aguas residual porcina. La cepa UTEX 2505 durante la semana 1 y 2 de estrés evidenció macrozooides, escasas aplanosporas en la semana 3 y palmelas en la semana 4. Por otra parte, la cepa UA en la semana 1 muestra macrozooides y durante la semana 2, 3 y 4 palmelas, células intermedias y aplanosporas.

Tabla 5. Cambios morfológicos de las cepas UTEX 2505 y UA en medio a partir de aguas residuales porcinas

| Semana | UTEX 2505 | UA |
|--------|---|--|
| 1 |  |  |
| 2 |  |  |
| 3 |  |  |
| 4 |  |  |

Nota: construcción propia, Quintero E. 2019.

7.2.3 Determinación de pH inicial y pH final de los medios de cultivo.

La tabla 6 muestra el resultado de los valores de pH en los medios de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5%, determinado en los medios iniciales y al final del ensayo con un potenciómetro. El valor de pH de los medios finales con agua residual doméstica demostró variación con respecto al valor inicial del medio, mientras que los medios con agua residual porcina no tuvieron cambios significativos de pH con respecto al inicial. (Tabla 6)

Tabla 6. Resultados de pH en medios de cultivo inicial y medios de cultivo al final del ensayo.

| pH inicial | |
|--------------------------|-----|
| Medio A.R.D 12,5% | 7,8 |
| Medio A.R.P 12,5% | 8,7 |
| pH final | |
| A.R.D UTEX 2505 | 9,0 |
| A.R.D UA | 6,8 |
| A.R.P UTEX 2505 | 8,9 |

Nota: construcción propia, Quintero E. 2019.

7.3 Determinación de clorofila y astaxantina

El método de extracción con metanol al 90% fue el elegido para este ensayo. La lectura de la absorbancia se realizó a 667 nm para clorofila y a 477 nm para astaxantina en el espectrofotómetro Genesys 10s uv-vis y se determinó las concentraciones con los datos de la curva de calibración realizada.

Para realizar la cuantificación de clorofila y astaxantina de los medios de cultivo a partir de aguas residuales domésticas y aguas residuales porcinas, se utilizó una

curva de calibración realizada con patrones de referencia con absorbancia en el eje Y, en función de la concentración en el eje X, expresada en µg/mL. (Fig. 16 y 17)

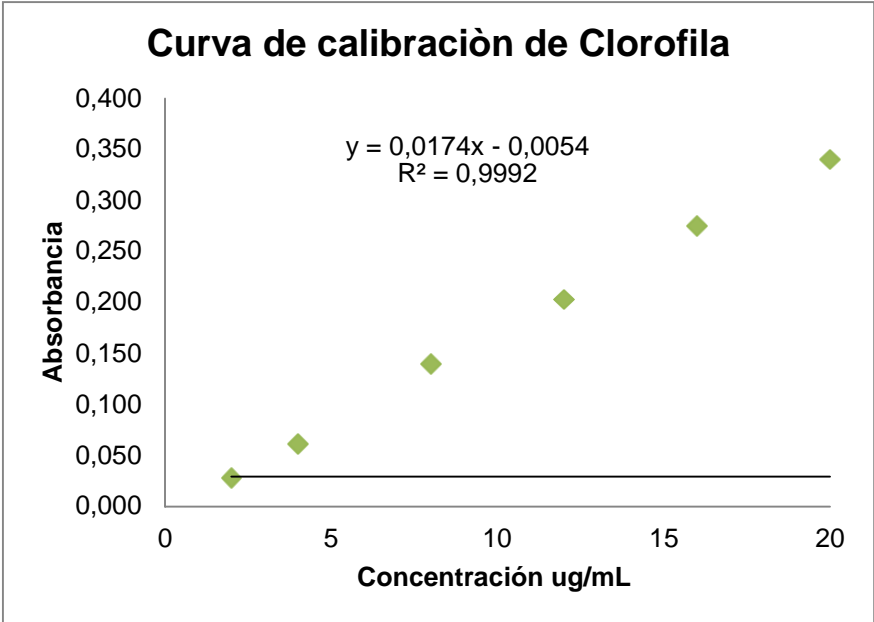


Fig. 16 Curva de calibración de clorofila. Construcción propia. Quintero, E. 2020

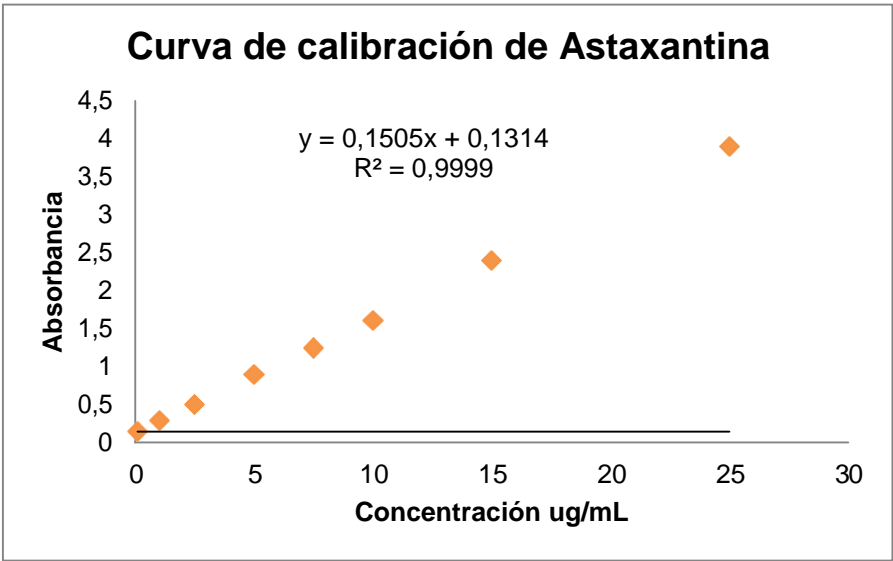


Fig. 17 Curva de calibración de astaxantina. Fuente: construcción propia, Quintero E. 2020

Los resultados de la cuantificación de clorofila en medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y medio de cultivo a partir de agua residual porcina, durante cuatro semanas de estrés celular se presentan en las figura 18. La grafica demuestra un descenso gradual en la concentración de clorofila durante la semana 1 a la 4 de estrés celular aplicado en los medios de cultivo con concentraciones finales menores a 6 µg/mL de clorofila.

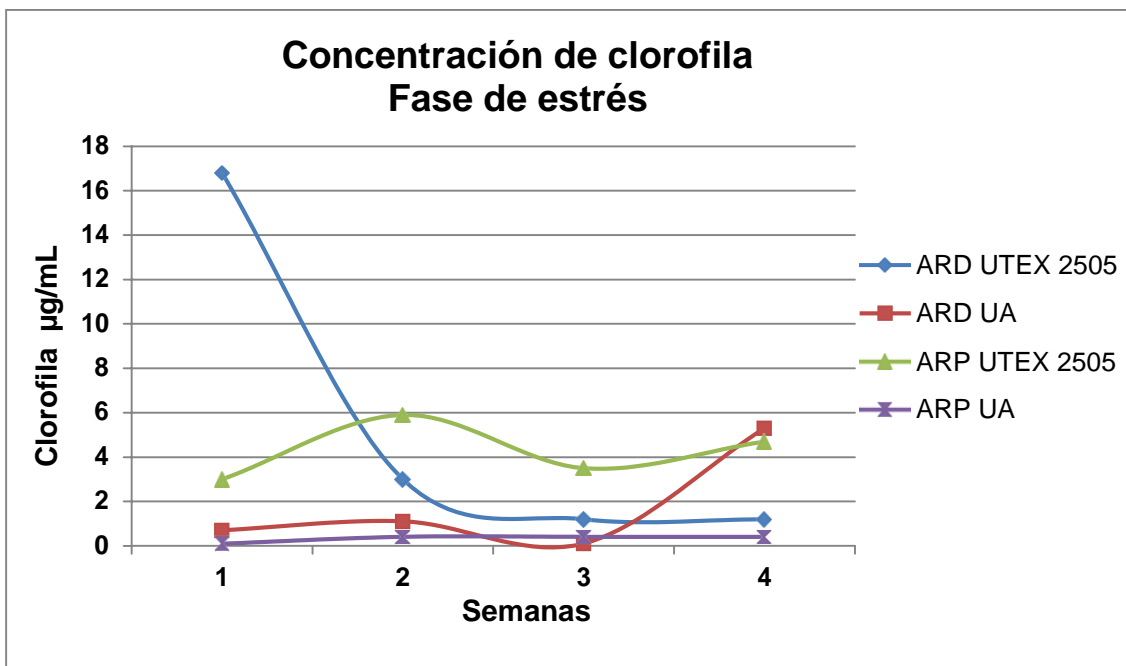


Fig. 18 Concentración de clorofila durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P.
Fuente: construcción propia, Quintero E. 2020

Los resultados de la cuantificación de astaxantina en medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y medio de cultivo a partir de agua residual porcina durante cuatro semanas de estrés celular se presentan en la figura 19 y tabla 7.

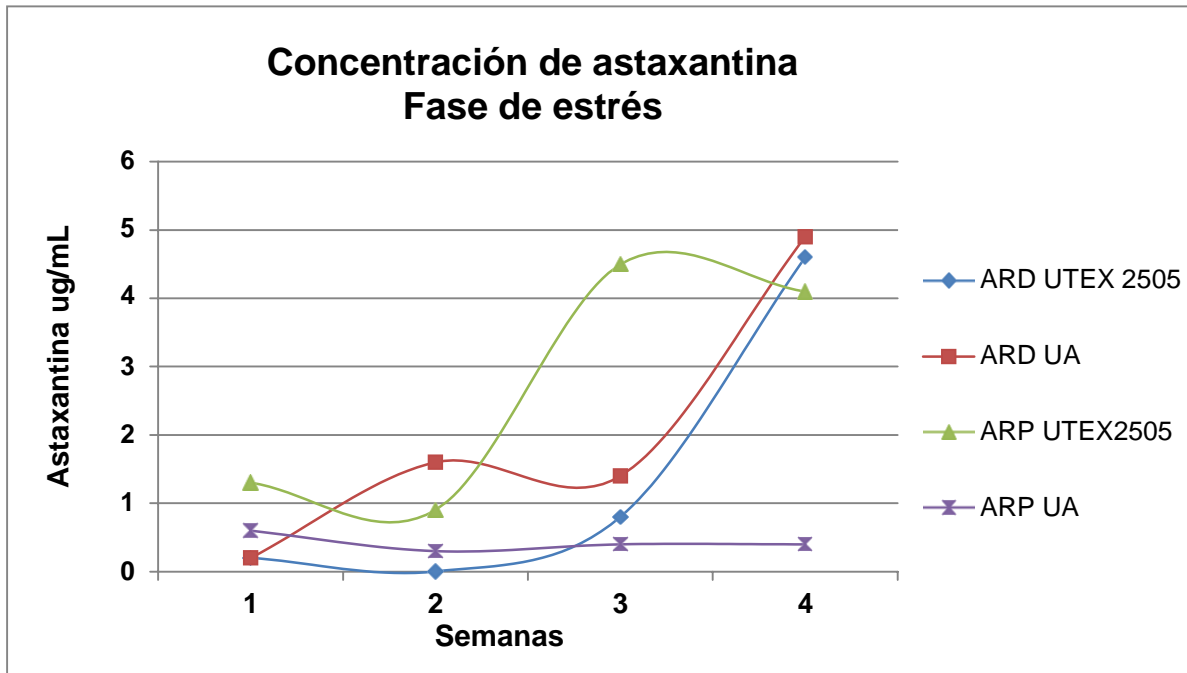


Fig. 19 Concentración de astaxantina durante la fase de estrés en los medios de cultivo A.R.D, A.R.P.
Fuente: construcción propia, Quintero E. 2020

Tabla 7. Resultados de la cuantificación de astaxantina durante la fase de estrés por espectrofotometría.

| Medios y cepas | Concentración de astaxantina ug/mL | | | |
|------------------------|------------------------------------|----------|----------|----------|
| | Semana 1 | Semana 2 | Semana 3 | Semana 4 |
| A.R.D UTEX 2505 | 0,2 | 0 | 0,8 | 4,6 |
| A.R.D UA | 0,2 | 1,6 | 1,4 | 4,9 |
| A.R.P UTEX 2505 | 1,3 | 0,9 | 4,5 | 4,1 |
| A.R.P UA | 0,6 | 0,3 | 0,4 | 0,4 |

Nota: Agua residual domestica (A.R.D), Agua residual porcina (A.R.P). Construcción propia, Quintero E. 2020

A partir de estos datos es posible evidenciar un incremento gradual de astaxantina en los medios de cultivo de agua residual doméstica con las dos cepas de *H. pluvialis* y agua residual porcina con la cepa UTEX 2505. Sin embargo, la cepa UA

no demostró concentraciones significativas de astaxantina en el medio de cultivo de agua residual porcina.

Los resultados de la concentración de astaxantina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), realizada para cada medio de cultivo en la semana 4 de estrés celular con duplicado de análisis se muestran en el anexo 3. Se empleó un Cromatógrafo Agilent® Technologies 1260 Infinity, equipado con una bomba binaria LC-6AD, detector de arreglo de diodos (DAD). La columna cromatográfica empleada fue una ZORBAX Eclipse plus C18 4,6 x 100mm, 3,5 µm de tamaño de partícula.

En la tabla 8 se evidencian los resultados de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), realizada para cada medio de cultivo al final del ensayo.

Tabla 8. Resultados de la cuantificación final de Astaxantina por HPLC.

| Medio de cultivo y cepa | Concentración (µg/mL) |
|--------------------------------|------------------------------|
| A.R.D UTEX 2505 | 5,401 |
| A.R.D. UA | 27,091 |
| A.R.P UTEX 2505 | 5,386 |
| A.R.P UA | 17,056 |

Nota: construcción propia, Quintero E 2020.

A partir de los datos de la tabla 8, se infiere que el medio de cultivo a partir de aguas residuales domesticas con la cepa UA presentó mayor concentración de astaxantina comparado con la cepa UTEX 2505. En cuanto al medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas, la cepa UTEX 2505 demostró menor concentración de astaxantina que la cepa UA.

8. Discusión

Este estudio se propuso con el fin de evaluar un medio de cultivo a partir de agua residual doméstica y agua residual porcina al 12,5% de su concentración para el crecimiento de la microalga *Haematococcus pluvialis* y la producción del pigmento astaxantina. Investigaciones previas han señalado la importancia ambiental de las aguas residuales, ya que sin una eliminación adecuada de compuestos orgánicos e inorgánicos durante su tratamiento, representan una fuente potencialmente contaminante para cuerpos de agua receptores, generando efectos negativos sobre la fauna acuática y dando lugar a procesos de eutrofización.¹¹ Cabe señalar que la producción de las microalgas presenta altos costos debido a los nutrientes que requiere el cultivo, por lo que se dificulta su producción a nivel industrial para obtener a partir de su biomasa, productos valiosos para la industria farmacéutica y alimenticia. Sin embargo, las microalgas resultan ser una alternativa para el tratamiento de las aguas residuales y estas a su vez representan un medio de cultivo gracias a su contenido nutricional para estos organismos, siendo de fácil acceso a un bajo costo.

La fase de crecimiento de *Haematococcus pluvialis* en este estudio tardó 29 días bajo condiciones ideales, enfocadas en macronutrientes disponibles en las aguas residuales domésticas y porcinas para las microalgas como el nitrógeno y fósforo y micronutrientes como Fe, Zn, Mn, Mg, S con fotoperíodos de luz/ oscuridad 18:6 h y agitación del medio. La evaluación del crecimiento en estos medios se determinó, pudiéndose comparar con la investigación de Kang y colaboradores,² cuyos resultados muestran un crecimiento celular de *H. pluvialis* promedio de 0,239 células/ día con agua residual diluida proveniente de una planta de tratamiento y 0,245 células/día en medio de agua residual porcina diluida en tanto que Sato y colaboradores,⁷ obtuvieron la tasa de crecimiento en agua residual filtrada y coagulada con 0,34 células/día al 5% de CO₂, comparado con los resultados de este estudio en el que la velocidad de crecimiento de *H. pluvialis* con medio a partir de agua residual doméstica para la cepa UTEX 2505 y UA fue de 0,029 y 0,023 células/día respectivamente; estos resultados demuestran que el medio

probablemente pudo inhibir el rápido crecimiento de las microalgas por sus abundantes desechos orgánicos y turbiedad haciendo indispensable eliminar estas interferencias en el cultivo.

Los medios de cultivo a partir de agua residual porcina en la investigación de Ledda y colaboradores, ⁸ mostró resultados de crecimiento rápido y productividad de biomasa con la suspensión preparada al 12,5% estando directamente relacionado con la baja turbidez del medio, ya que acudieron a técnicas de filtrado más sofisticadas que las aplicadas en el presente ensayo, donde contrario a lo esperado, la velocidad de crecimiento celular para la cepa UTEX 2505 y UA fue de 0,030 y 0,016 células/día respectivamente y las diferencias entre la poca densidad celular alcanzada durante la fase de crecimiento están relacionadas con la turbiedad del medio inicial, interfiriendo con la disponibilidad de la luz o por un nivel excesivo de nutrientes o pH que resulta toxico para las microalgas, afectando directamente el crecimiento celular.^{10,11}

En cuanto a la densidad celular con medio a partir de aguas residuales domésticas, la cepa UTEX 2505 fue representativa con 3409×10^4 células/ ml en contraste con el estudio de Wu y colaboradores, ⁴ quienes obtuvieron una densidad máxima de $8,5 \times 10^4$ células/mL de *H. pluvialis* siendo la más alta comparada con especies de *Chlorella* y *Scenedesmus*, lo que permite inferir que esta investigación presentó mayor densidad celular en simultaneo con la asimilación de nitrógeno y fósforo disponible en las aguas residuales para el crecimiento de la microalga. Desafortunadamente, la eliminación del nitrógeno y fósforo en los medios estudiados no se determinó. Sin embargo, en las investigaciones previas que se encuentran relacionadas, mencionan la relación entre la concentración de biomasa con la eliminación de nutrientes del medio como el nitrógeno y fósforo entre el 90% y 99% del total. ^{2, 5, 7,8}

Los resultados de este estudio indican que el medio de cultivo a partir de agua residual domestica al 12,5% presentó un mejor desempeño en cuanto al crecimiento

celular de la cepa UTEX 2505 y UA de *H. pluvialis*. En contraste con el medio de cultivo a partir de agua residual porcina al 12,5%, en el que se evidenció menor concentración celular con la cepa UA que con UTEX 2505 de *H. pluvialis*.

La segunda fase de la investigación en la que se expuso a la microalga *H. pluvialis* a condiciones de estrés de alta intensidad de luz, fotoperiodo prolongado de 20:4 h y limitación de nutrientes en el medio por consumo en la fase de crecimiento y evidenciado en los registros fotográficos con células palmela e intermedias finalizando la primera fase, permitió la síntesis y acumulación de astaxantina con la formación de aplanosporas en los medios de cultivo.^{4, 10}

El seguimiento de la producción de clorofila y astaxantina se realizó durante las cuatro semanas de estudio mediante técnica espectrofotométrica y para la última semana del estudio se evaluó la concentración de astaxantina final en los medios de cultivo mediante HPLC. La cuantificación de clorofila mediante método espectrofotométrico mostró una sustancial disminución desde la semana 1 de estrés hasta la semana 4 en los dos medios de cultivo a partir de aguas residuales. Este hallazgo corrobora la investigación previa de Kang y colaboradores,² donde la clorofila y por tanto el crecimiento celular disminuyeron por el agotamiento del nitrato disponible en el medio sin la interferencia del fosfato. Sato *et al*,⁷ menciona que en los días 17 a 31 de su cultivo el contenido de clorofila fue más bajo que el de astaxantina. En contraste con este resultado, el contenido de clorofila obtenido fue más alto que los valores de la astaxantina en el inicio de estrés celular en aguas residuales domésticas, determinada por espectrofotometría con 16,8 µg/mL de clorofila y 0,2 µg/mL de astaxantina, porque durante ese periodo de tiempo la microalga estaba cambiando de fase de crecimiento a fase de estrés.

En concordancia con lo anterior, la luz continua a la que se sometieron los medios de cultivo en la fase de estrés celular, dio lugar al paso de células vegetativas a aplanosporas acumulando astaxantina por la generación de especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo. Esto resultados se relacionan con lo que menciona Zhu y colaboradores,¹⁰¹ con respecto a la degradación de las membranas tilacoidales durante el enquistamiento, logrando una rápida descomposición de la clorofila *a* y *b*

presente. Además, Mascia y colaboradores, ¹⁰² también indican que la maquinaria fotosintética se reorganiza cuando ocurre la síntesis de astaxantina por la inducción de aumento de luz irradiada, reduciendo el volumen de los cloroplastos, los tilacoides y desestabilizando los fotosistemas I y II.

La acumulación de astaxantina en las aplanosporas de *H. pluvialis* durante las cuatro semanas de estrés celular aumentó progresivamente en los medios de cultivo a partir de aguas residuales domésticas con la cepa UTEX 2505 con una concentración inicial de 0,2 µg/mL y una concentración final de 4,6 µg/mL, la cepa UA en el mismo medio de cultivo con concentración inicial de 0,2 µg/mL y concentración final de 4,9 µg/mL. El medio de cultivo a partir de agua residual porcina con la cepa UTEX 2505 obtuvo 1,3 µg/mL en la primera semana y 4,1 µg/mL en la cuarta semana de estudio. En cuanto a las concentraciones de astaxantina de la cepa UA, estas se mantuvieron en valores de 0,6 µg/mL y 0,4 µg/mL determinadas mediante espectrofotometría. Los resultados de la cromatografía líquida de alta eficiencia arrojaron mayores concentraciones finales de astaxantina en los medios de cultivo evaluados, siendo representativos los resultados del medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas con la cepa UA con un promedio de 17,05 µg/mL comparada con los resultados obtenidos por espectrofotometría con resultados iguales a 0 µg/mL y el medio de cultivo a partir de agua residual doméstica con la cepa UA con un promedio de 27,09 µg/mL de astaxantina. Las discrepancias en los resultados de la medición de astaxantina del último día del ensayo mediante método espectrofotométrico y HPLC, demuestra la sensibilidad de cada técnica, ya que por la naturaleza de los carotenos, las concentraciones por espectrofotometría pudieron alterarse por acción de la temperatura o el pH, mientras que los resultados de HPLC presentaron mayores concentraciones de astaxantina, gracias a que esta técnica ofrece una metodología bajo ausencia de luz, control de temperatura y aireación. ^{96, 97,98}

Estos resultados difieren de los presentados por Kang y colaboradores, ² en medios a partir de agua residual doméstica tratada con resultados de astaxantina de 39,7 mg/ L y 42,3 mg/L de astaxantina en agua residual porcina diluida ocho veces con *H.*

pluvialis, aunque las condiciones de cultivo fueron diferentes porque adicionaron CO₂ a los medios. Otro hallazgo de Ledda y colaboradores⁸ con medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas al 12,5% proporcionó una concentración final de astaxantina menor que las obtenidas por Kang y colaboradores² con la diferencia de que en dicho estudio mantuvieron una irradiancia baja constantemente. En cuanto a los resultados de astaxantina en aguas residuales porcinas con la cepa UA de este estudio, existe una relación entre la poca concentración de biomasa por paso interrumpido de la luz hacia el medio. La productividad de astaxantina en estos medios fue relativamente baja pero resulta ser un proceso importante para el tratamiento de las aguas residuales por acción de sus componentes orgánicos e inorgánicos que propician el crecimiento y síntesis de *H. pluvialis* mediante procesos económicos. ^{2, 6, 11,12}

Se sugiere que futuras investigaciones se enfoquen en la evaluación de otras condiciones ambientales para los medios de cultivo a partir de aguas residuales mediante técnicas más optimizadas que permitan obtener mayor concentración de pigmentos de alto valor como la astaxantina, además del uso de este recurso proveniente de otras fuentes en mayores cantidades sin afectar directamente la viabilidad de las microalgas.

9. Conclusiones

El agua residual doméstica y agua residual porcina son aquellas que por el uso del ser humano son eliminadas y representan un potencial factor de contaminación al ser vertidas en otras fuentes de agua. Están conformadas por arena, productos sanitarios, plástico y sustancias químicas orgánicas como lípidos, proteínas, carbohidratos, además las sustancias inorgánicas con altas concentraciones de nitrógeno, fósforo que provienen de orina, heces, desechos de alimentos y alta carga de microorganismos como bacterias, virus y protozoos que pueden provocar la contaminación de aguas superficiales y subterráneas. El tratamiento de estos residuos a base de microalgas puede lograr la eliminación de nutrientes de las aguas residuales de una manera menos costosa y ecológicamente más segura, con beneficios adicionales como la producción de biomasa y pigmentos de alto valor comercial como la astaxantina.

El cultivo de *Haematococcus pluvialis* en aguas residuales domésticas y porcinas, permitió producir astaxantina. En la fase inicial del cultivo se proporcionan las condiciones ideales para el crecimiento de la microalga, esta fase se caracteriza por la disponibilidad de nutrientes en el medio para su asimilación y producción de biomasa, además de fotoperiodos luz / oscuridad 18:6h para la síntesis de clorofila. La segunda fase del estudio buscó generar condiciones estresantes en el medio, caracterizadas por la privación de los nutrientes, los cuales fueron consumidos durante el crecimiento y la exposición a fotoperiodos más largos luz /oscuridad 20:4 h con lámparas de luz blanca a 22.512 luxes y agitación manual diaria para sintetizar la astaxantina.

Los resultados de la investigación demostraron que las dos cepas *H. pluvialis* (UTEX 2505 y UA), asimilaron los componentes de las aguas residuales domésticas y porcinas proporcionadas en los medios de cultivo. El medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas generó mayor concentración celular con UTEX 2505 siendo de 3409×10^4 células/mL, comparado con el medio de cultivo a partir de aguas residuales porcinas, el cual se caracterizó inicialmente por su turbidez impidiendo el paso de luz a las microalgas, lo que explicaría las diferencias entre la biomasa

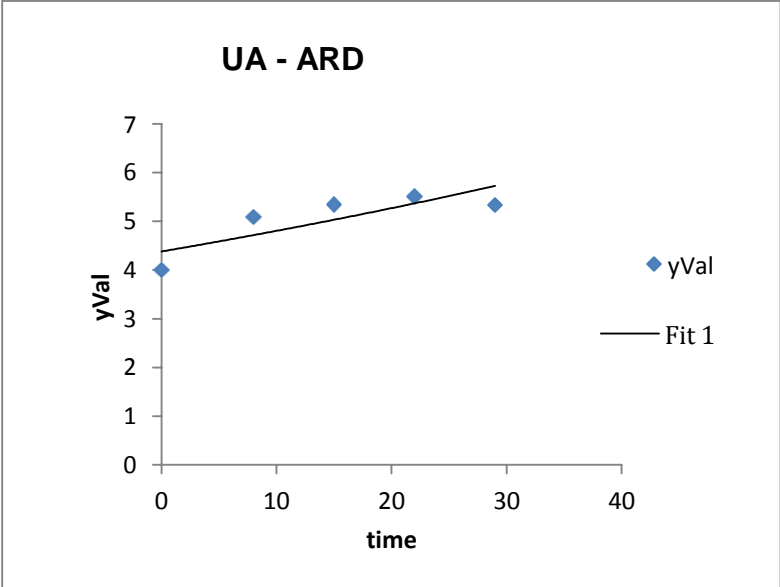
producida entre los dos medios evaluados. Además, se demostró que para una confianza del 95% existen diferencias estadísticamente significativas ($P= 0,05$) entre las medias de crecimiento de las cepas de *H. pluvialis*.

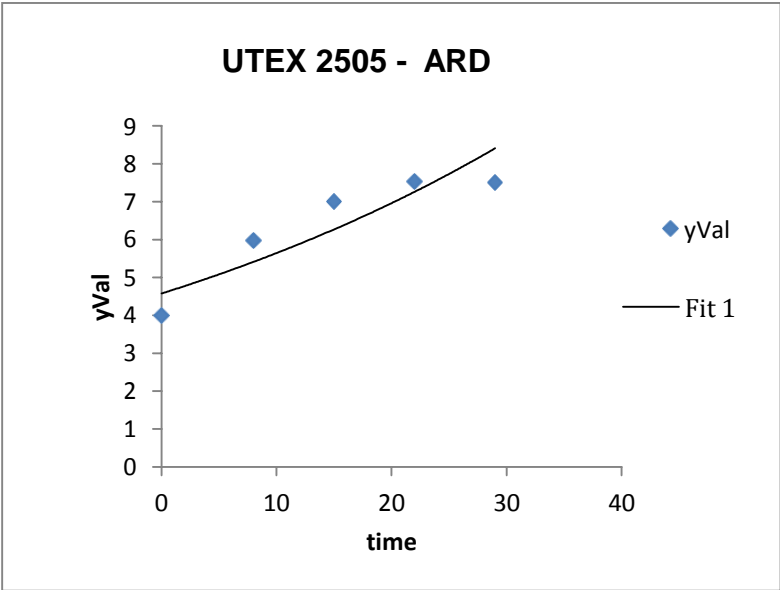
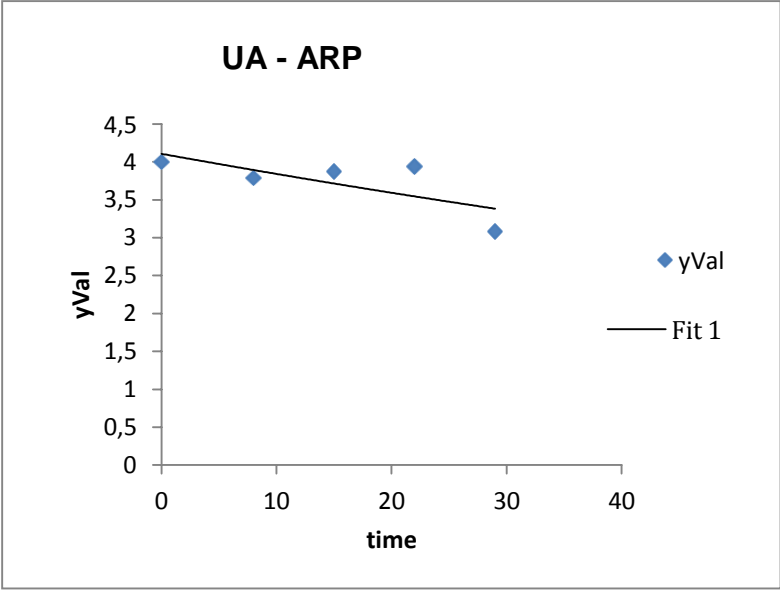
La concentración de clorofila y astaxantina se determinó aplicando técnicas espectrofotométricas y de cromatografía líquida de alta eficiencia. Los valores de clorofila disminuyeron progresivamente desde la fase de estrés celular y simultáneamente la astaxantina se incrementó. Frente a esto, la concentración final de astaxantina fue mayor con la cepa UA de *H. pluvialis* en el medio de cultivo a partir de aguas residuales domésticas, obteniéndose mediante la técnica espectrofotométrica 4,9 ug/mL y por cromatografía líquida de alta eficiencia 27,091 ug/mL. Las discrepancias en los datos obtenidos por espectrofotometría y HPLC se deben a la sensibilidad y condiciones de cada técnica, teniendo en cuenta la naturaleza de los carotenos que fácilmente pueden verse alterados. Los resultados de este estudio apoyan la idea de obtener pigmentos de gran valor comercial, mediante la utilización de las aguas residuales domésticas y porcinas, siendo medios de cultivo ideales para las microalgas que requieren poca inversión y generan un gran impacto a nivel ambiental y de salud.

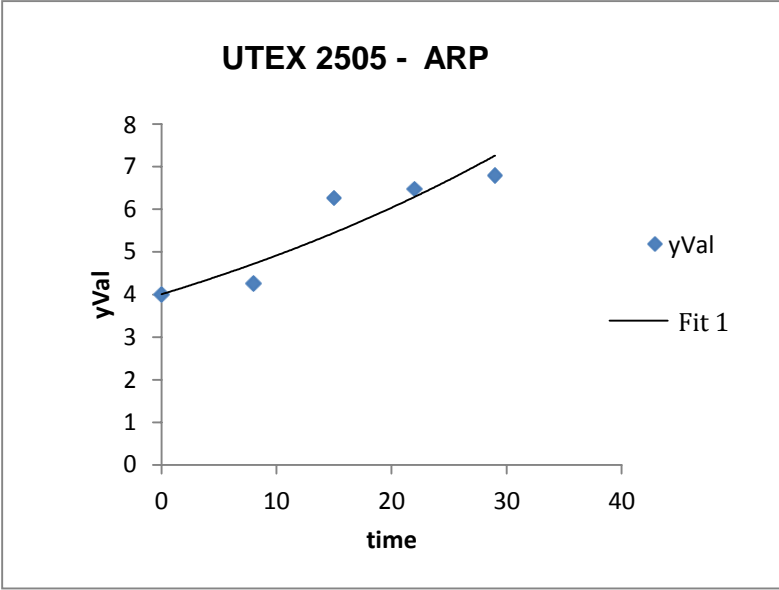
Anexos

Anexo 1

Ajuste de datos para curvas de crecimiento celular de los medios de cultivo a partir de aguas residuales domesticas (ARD) y aguas residuales porcinas (ARP) con las cepas UTEX 2505 y UA.







Anexo 2

Análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Promedio de los cuadrados | F | Probabilidad | Valor crítico para F |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------|---------------------|-----------------------------|
| Cepas de <i>H. pluvialis</i> | 4014205,4 | 1 | 4014205,441 | 2 | 7 | 4,493998 |
| Medios de cultivo | 2154541,1 | 1 | 2154541,11 | 7 | 8 | 4,493998 |
| Interacción | 2044801,2 | 1 | 2044801,25 | 3 | 2 | 4,493998 |
| Dentro del grupo | 11310862,6 | 16 | 706928,9151 | | | |
| Total | 19524410,4 | 19 | | | | |

Anexo 3

Resultados cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

| Nombr e | Códig o | Tiempo de retenció n | Área (mAU) | Concentraci ón | FD | Resultad o (µg/mL) |
|------------|------------|-------------------------------|---------------|-------------------|----|--------------------------|
| ARP10 | 1G | 2,147 | 200401 | 0,059 | 10 | 0,591 |
| | | 2,15 | 199703 | 0,059 | 10 | 0,588 |
| ARD6 | M2G | 2,24 | 3796496 | 1,857 | 10 | 18,572 |
| | | 2,237 | 3910152 | 1,914 | 10 | 19,140 |
| ARD5 | M4G | 2,28 | 7297839 | 3,608 | 10 | 36,078 |
| | | 2,278 | 6997421 | 3,458 | 10 | 34,576 |
| ARP11 | M5G | 2,273 | 8680990 | 4,299 | 10 | 42,994 |
| | | 2,3 | 8498764 | 4,208 | 10 | 42,083 |
| ARP9 | M6G | 2,273 | 386692 | 0,152 | 10 | 1,523 |
| | | 2,3 | 394713 | 0,156 | 10 | 1,563 |
| ARP12 | M7G | 2,28 | 1703447 | 0,811 | 10 | 8,106 |
| | | 2,3 | 1913743 | 0,916 | 10 | 9,158 |
| ARP7 | M8G | 2,23 | 2327073 | 1,122 | 10 | 11,224 |
| | | 2,24 | 2460962 | 1,189 | 10 | 11,894 |
| C14 | M9G | 2,23 | 2094345 | 1,006 | 10 | 10,061 |
| | | 2,24 | 2208455 | 1,063 | 10 | 10,631 |
| ARP8 | M10G | 2,23 | 676847 | 0,297 | 10 | 2,973 |
| | | 2,23 | 709890 | 0,314 | 10 | 3,139 |
| ARD3 | M11G | 2,24 | 790091 | 0,354 | 10 | 3,540 |
| | | 2,24 | 814086 | 0,366 | 10 | 3,660 |
| ARD2 | M12G | 2,24 | 1572129 | 0,745 | 10 | 7,450 |
| | | 2,237 | 1473214 | 0,696 | 10 | 6,955 |

Nota: Las muestras ARD4 y ARD1 presentan muy poco volumen para inyección.

Referencias

1. Oswald W, Gotaas H, Gouleke C, Kellen W. 1957. Algae in waste treatment. [Internet]. Sewage and industrial waste, 29 (4): 437- 457. [Citado 03 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.jstor.org/journal/sewainduwast>
2. Kang C, Jin Y, Tai H, Sang J. 2006. Astaxanthin biosynthesis from simultaneous N and P uptake by the green alga *Haematococcus pluvialis* in primary-treated wastewater. [Internet]. Biochemical Engineering Journal, 31, 234–238. [Citado 03 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X06001999>
3. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar G. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. [Internet]. Journal of Experimental Botany, 59 (6), 1409–1418. [Citado 03 noviembre 2019]. Disponible en: <https://academic.oup.com/jxb/article/59/6/1409/485379>
4. Camacho J, González G, Klotz B. 2013. Producción de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. [Internet]. Nova, 11 (19), 94-104. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702013000100009
5. Wu Y, Yang J, Hu H, Yu Y. 2013. Lipid rich microalgal biomass production and nutrient removal by *Haematoococcus pluvialis* in domestic secondary effluent. [Internet]. Ecological engineering, 60 (2013): 155- 159. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0925857413003170?via%3Dihub#bib0055>
6. Guang JZ, Guang GY, Shan L, Li JZ, Zhi FCh, Fu QP. 2014. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green

microalgae. [Internet]. Environmental science processes and impacts, 16, 2018-2027. [Citado 03 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24953257>

7. Sato H, Nagare H, Huynh TNC, Komatsu H. 2015. Development of a new wastewater treatment process for resource recovery of carotenoids. [Internet]. Water science and technology, 72 (7), 1191- 1197. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://iwaponline.com/wst/article-lookup/doi/10.2166/wst.2015.330>

8. Ledda C, Tamiazzo J, Borin M, Adani F. 2016. A simplified process of swine slurry treatment by primary filtration and *Haematococcus pluvialis* culture to produce low cost astaxanthin. [Internet]. Ecological Engineering, 90, 244-250. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925857416300337>

9. Panis G, Rosales J. 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. [Internet]. Algal research, 18, 175-190. [Citado 04 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S2211926416301965>

10. Guldhe A, Kumari S, Ramanna L, Ramsundar P, Singh P, Rawa I, Bux F. 2017. Prospects, recent advancements and challenges of different wastewater streams for microalgal cultivation. [Internet]. Journal of environmental management, 203 (1), 299-315. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0301479717307892>

11. Chew K, Chia S, Pau L, Yap Y, Ling T, Chang, J. 2018. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. [Internet]. Journal Of The Taiwan Institute Of Chemical Engineers, 91, 332-344. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1876107018303134#bib0024>

12. Halip A, Yaakob Z, Sheikh S, Sobri M. 2019. Assessing the feasibility of microalgae cultivation in agricultural wastewater: the nutrient characteristics. [Internet]. Environmental technology & innovation, 15 (2019): 100402. [Citado 06 abril 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S2352186418305169>
13. Espigares M, Pérez JA. 2017. Aguas residuales composición. [Internet]. Universidad de Salamanca [Citado 20 noviembre 2019]. Disponible en: http://cidta.usal.es/cursos/EDAR/modulos/Edar/unidades/LIBROS/logo/pdf/Aguas_Residuales_composicion.pdf
14. Morrison RD, Murphy BL. Environmental Forensics. Contaminant specific guide. Editorial Elsevier; 2005.
15. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. [Internet]. Roma: MB Pescod; 1992 [citado 16 agosto 2020]. Disponible en: <http://www.fao.org/3/t0551e/t0551e03.htm#1.%20wastewater%20characteristics%20and%20effluent%20quality%20parameters>
16. Orozco C, González I, Saucedo R, Flores H, Rubio H, Ochoa R. 2018. Removing organic matter and nutrients from pig farm wastewater with a constructed wetland system. [Internet]. International journal of environmental research and public health 15(5): 1-16. [Citado 26 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5982070/>
17. Nagarajan D, Kusmayadi A, Yen H, Dong C, Lee D, Chang J. 2019. Current advances in biological swine wastewater treatment using microalgae based processes. [Internet]. Bioresource technology 289(2019) 121718. [Citado 26 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5982070/>

18. Muttamara S. 1996. Wastewater characteristics. [Internet]. Resources, conservation and recycling 16 (1-4): 145-159. [Citado 16 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0921344995000526>
19. Cyprowski M, Kupiec A, Walczyk A, Kijek A, Szymczak M, Górny R. 2018. Anaerobic bacteria in wastewater treatment plant. [Internet]. International archives of occupational and environmental health 91 (5): 571-579. [Citado 16 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6002452/>
20. Raouf N, Homaidan A, Ibraheem I. 2012. Microalgae and wastewater treatment. [Internet]. Saudi journal of biological sciences 19(3): 257- 275. [Citado 16 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052567/>
21. Von Sperling M. Wastewater characteristics, treatment and disposal. Volumen 1. London: IWA publishing; 2007.
22. Wang J, Zhang T, Dao G, Xu X, Wang X, Hu H. 2017. Microalgae based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies. [Internet]. Applied microbiology and biotechnology 101: 2659- 2675. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-017-8184-x>
23. Yang J, Monnot M, Ercolei L, Moulin P. 2020. Membrane based processes used in municipal wastewater treatment for water reuse: state of the art and performance analysis. [Internet]. Membranes 10(6):131. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7344726/>
24. Cai T, Li Y. 2013. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospect. [Internet]. Renewable and sustainable energy reviews 19: 360-369. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S1364032112006429?via%3Dihub>

25. Slocombe S, Burgos T, Chu L, Wood N, Valero M, Baker A. 2020. Fixing the broken phosphorus cycle: wastewater remediation by microalgal polyphosphates. [Internet]. *Frontiers in plant science* 11: 982. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339613/>
26. Chachal C, Van de Akker B, Young F, Franco C, Blackbeard J, Monis P. 2016. Pathogen and particle associations in wastewater. [Internet]. *Advances in applied microbiology* 97: 63-119. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126130/#bib1>
27. Varela A, Manaia C. 2013. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. [Internet]. *Environmental science and pollution research international* 20(6): 3550- 3569. [Citado 17 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23508533/>
28. Corpuz M, Buonerba A, Vigliotta G, Zarra T, Ballesteros F, Campiglia P. *et al.* 2020. Viruses in wastewater: occurrence, abundance and detection methods. [Internet]. *The science of the total environment* 745: 1-26. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7368910/>
29. Farkas K, Walker D, Adriaenssens E, McDonald J, Hillary L, Malham S. *et al.* 2020. Viral indicators for tracking domestic wastewater contamination in the aquatic environment. [Internet]. *Water research* 181: 1-20. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7211501/>
30. Ashbolt N. 2004. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. [Internet]. *Toxicology* 198(1): 229- 238. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126529/>
31. Kitajima M, Ahmed W, Bibby K, Carducci A, Gerba C, Hamilton K, Haramoto E, *et al.* 2020. SARS- CoV-2 in wastewater: state of the knowledge and research needs. [Internet]. *The science of the total environment* 729: 139076. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7191289/>

32. Ahmend W, Angel N, Edson J, Bibby K, Bivins A, O'Brien B, *et al.* 2020. First confirmed detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewater in Australia: A proof of concept for the wastewater surveillance of COVID-19 in the community. [Internet]. *The science of the total environment* 728: 138764. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32387778/>
33. Huang C, Hu Y, Wang L, Wang Y, Li N, Gou Y, *et al.* 2017. Environmental transport of emerging human pathogenic *Cryptosporidium* species and subtypes through combined sewer overflow and wastewater. [Internet]. *Applied and environmental microbiology* 83 (16):1- 11. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5541217/>
34. Rudko S, Ruecker N, Ashbolt N, Neumann N, Hanington P. 2017. *Enterobius vermicularis* as a novel surrogate for the presence of Helminth ova in tertiary wastewater treatment plants. [Internet]. *Applied and environmental microbiology* 83(11): 1-13. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440721/>
35. Gil M, Soto A, Usma J, Gutiérrez O. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. [Internet]. *Producción más limpia* 7(2):52-73. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v7n2/v7n2a05.pdf>
36. Rogowska J, Semenowicz M, Rtajczyk W, Wolska L. 2020. Micropollutants in treated wastewater. [Internet]. *Ambio* 49(2): 487-503. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6965340/>
37. Chen M, Qi R, An W, Zhang H, Wei Y, Zhou Y. 2009. New concept of contaminant removal from swine wastewater by a biological treatment process. [Internet]. *Frontiers of biology in China* 4(4): 402-413. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11515-009-0042-5>

38. Petrie B, Barden R, Kasprzyk B. 2015. A review on emerging contaminants in wastewater and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. [Internet]. *Water research* 72(2015): 3-27. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25267363/>
39. Shah MR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. 2016. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. [Internet]. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. [Citado 20 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848535/>
40. Granda Jara GP. 2015. Producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Tesis pregrado]. Universidad de las Américas. Facultad de ingeniería y ciencias agropecuarias [Citado 20 noviembre 2019]. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
41. Martinez M, Jiménez M, Yousfi E. 1999. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. [Internet]. *Bioresource technology* 67: 233-240. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0960852498001205>
42. Lowrey J, Armenta R, Brooks M. 2016. Nutrient and media recycling in heterotrophic microalgae cultures. [Internet]. *Applied microbiology and biotechnology* 100(3): 1061-1075. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/docview/1757865022?pq-origsite=summon>
43. Ghafari M, Rashidi B, Haznedaroglu B. 2016. Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. [Internet]. *Journal Biofuels* 9(2):147-156. [Citado 20 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2388/doi/citedby/10.1080/17597269.2016.1221644?scroll=top&needAccess=true>

44. Higuera I, Valenzuela FL, Goycoolea FM. 2007. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications.[Internet]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 46, 185-196. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2388/doi/full/10.1080/10408690590957188>
45. Gong M, Bassi A. 2016. Carotenoids from microalgae: a review of recent developments.[Internet]. *Biotechnology advances*, 34, 1396-1412. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0734975016301355>
47. Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. 2014. Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production.[Internet]. *Bioresource technology*, 158, 329-335. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0960852414002156>
48. Dong QL, Zhao XM. 2004. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. [Internet]. *Catalysis today*, 98, 537-544. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0920586104005735>
49. Sun H, Kong Q, Zhaoyan G, Duan L, Yang M, Guan B. 2015. Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. *Bioresource technology*, 186, 67-73. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0960852415002874>
50. Hu J, Nagarajan D, Zhang Q, Chang J, Lee DJ. 2018. Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review.[Internet]. *Biotechnology advances*, 36, 54-67. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0734975017301209>
51. Guerin M, Huntley ME, Olaizola M. 2003. *Haematococcus astaxanthin*: applications for human health and nutrition. [Internet]. *Trends in biotechnology*, 21, 210-216. [Citado 30 noviembre 2019]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0167779903000787>

52. Ranga R, Phang S, Sarada R, Ravishankar G. 2014. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Application. A Review. [Internet]. *Marine drugs* 12(1): 128 - 152. [Citado 22 de Julio 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917265/>
53. Mont L, Jucá A, Campos F. 2010. Astaxanthin: structural and functional aspects. [Internet]. *Nutrição* 23(6): 1041 – 1050. [Citado 22 de Julio 2020]. Disponible en: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732010000600010&script=sci_arttext
54. Butler T, Golan Y. 2020. Astaxanthin production from microalgae. [Internet]. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. Springer 175-242. [Citado 22 de Julio 2020]. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-0169-2_6
55. Shah MR, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M. 2016. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. [Internet]. *Frontiers in Plant Science*, 7, 531. [Citado 20 noviembre 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4848535/>
56. Danxiang Han, Yantao Li, Qiang Hu. 2013. Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. [Internet]. *Algae* 28(2): 131-147 [Citado 09 Junio 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/docview/1372334314/fulltextPDF/1C1758A036BA4831PQ/1?accountid=50438>
57. Gwak Y, Hwang Y, Wang B, Kim M, Jeong J, Lee C, Hu Q, Han D, Jin E. 2014. Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. *Journal of Experimental Botany* 65 (15): 4317- 4334. [Citado 03 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4112636/>
58. Britton G, Young A. 1993. Biosynthesis of carotenoids, in carotenoids in photosynthesis. [Internet]. Springer 96-126. [Citado 03 de Agosto 2020]. Disponible

en: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-94-011-2124-8_4#citeas

59. Wang J, Sommerfeld M, Hu Q. 2009. Occurrence and environmental stress responses of two plastid terminal oxidases in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [Internet]. *Planta* 230 (1): 191- 203. [Citado 03 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19408010/>

60. Vidhyavathi R, Venkatachalam L, Sarada R, Ravishankar G. 2008. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. [Internet]. *Journal of experimental botany* 59(6): 1409 – 1418. [Citado 03 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18343887/>

61. Liu J, Sun Z, Gerken H, Liu Z, Jiang Y, Chen F. 2014. *Chlorella zofingiensis* as an alternative microalgal producer of astaxanthin: biology and industrial potential. [Internet]. *Marine drugs* 12(6): 3487- 3515. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4071588/>

62. Zhang Z, Wang B, Hu Q, Sommerfeld M, Li Y, Han D. 2016. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. *Biotechnology and Bioengineering* 113(10): 2088-2099. . [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5071682/>

63. Henke N, Heider S, Peters P, Wendisch V. 2016. Production of the marine carotenoid astaxanthin by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*. [Internet]. *Marine drugs* 14(7) 124. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4962014/>

64. Katsumata T, Ishibashi T, Kyle D. 2014. A sub-chronic toxicity evaluation of a natural astaxanthin rich carotenoid extract of *Paracoccus carotinifaciens* in rats. [Internet]. *ELSEVIER* 1: 582- 588. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5598279/>

65. Hayashi M, Kawamura M, Kawashima Y, Uemura T, Maoka T. 2020. Effect of astaxanthin rich extract derived from *Paracoccus carotinifaciens* on the status of stress and sleep in adults. [Internet]. Journal of clinical biochemistry and nutrition 66(2): 92- 102. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7093296/>
66. Rodríguez I, Vázquez J. 2015. Mussel processing wastewater: a low cost substrate for the production of astaxanthin by *Xanthophyllomyces dendrorhous*. [Internet]. Microbial cell factories 14: 177. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4640366/>
67. Miura Y, Kondo K, Saito T, Shimada H, Fraser P, Misawa N. 1998. Production of the carotenoids lycopene, β -carotene, and astaxanthin in the food yeast *Candida utilis*. [Internet]. Applied and environmental microbiology 64(4): 1226- 1229. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106133/>
68. Kot A, Blazejak S, Kurcz A, Gientka I, Kieliszek M. 2016. *Rhodotorula glutini* potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. [Internet]. Applied microbiology and biotechnology 100: 6103- 6117. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4916194/>
69. Zhao Y, Guo L, Xia Y, Zhuang X, Chu W. 2019. Isolation, identification of carotenoid producing *Rhodotorula* sp. from marine environment and optimization for carotenoid production. [Internet]. Marine drugs 17(3):161. [Citado 04 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471075/>
70. Sathasivam R, Ki J. 2018. A review of the biological activities of microalgal carotenoids and their potential use in healthcare and cosmetic industries. [Internet]. Marine drugs 16(1):26. [Citado 05 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793074/>
71. Galasso C, Orefice I, Pellone P, Cirino P, Miele R, Lanora A, Brunet C, Sansone

- C. 2018. On the neuroprotective role of astaxanthin: new perspectives? [Internet]. *Marine drugs*. 16(8):247. [Citado 08 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117702/>
72. Wu H, Niu H, Shao A, Wu Ch, Dixon B, Zhang J, Yang S, Wang Y. 2015. Astaxanthin as a potential neuroprotective agent for neurological diseases. [Internet]. *Marine drugs* 13(9): 5750-5766. [Citado 05 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584352/>
73. Kim S, Lim J, Kim H. 2018. Astaxanthin inhibits mitochondrial dysfunction and interleukin -8 expression in *Helicobacter pylori* infected gastric epithelial cells. [Internet]. *Nutrients* 10(9):1320. [Citado 08 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6164770/>
74. Davinelli S, Nielsen M, Scapagnini G. 2018. Astaxanthin in skin health, repair and disease: a comprehensive review. [Internet]. *Nutrients* 10(4):522. [Citado 08 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5946307/>
- 75 Landon R, Gueguen V, Petite H, Letourneur D, Pavon G, Anagnostou F. Impact of astaxanthin on diabetes pathogenesis and chronic complications. [Internet]. *Marine drugs* 18(7): 357. [Citado 08 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7401277/>
76. Zhang L, Wang H. 2015. Multiple mechanisms of anti-cancer effects exerted by astaxanthin. [Internet]. *Marine drugs* 13(7): 4310-4330. [Citado 08 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4515619/>
77. Ferreira V, Sant'Anna Celso. 2016. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. [Internet]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:20. [Citado 20 Abril 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2181-6>
78. Nwe Y, Chaw M, Thi K. 2017. Extraction and determined of chlorophyll content from microalgae.[Internet].*International journal of advanced research and*

publications 1(5): 298 -301. [Citado 09 de Agosto 2020]. Disponible en: <http://www.ijarp.org/published-research-papers/nov2017/Extraction-And-Determination-Of-Chlorophyll-Content-From-Microalgae.pdf>

79. Loughlin P, Willows R, Chen M. 2014. In vitro conversion of vinyl to formyl groups in naturally occurring chlorophylls. [Internet]. Scientific reports 4: 6069. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/srep06069>

80. Hosikian A, Lim A, Halim R, Danquah M. 2010. Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. [Internet]. International journal of chemical engineering 2010: 1-11. [Citado 09 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijce/2010/391632/>

81. Humphrey A. 2004. Chlorophyll as a color and functional ingredient. [Internet]. Journal of food science 69(5): 422-425. [Citado 09 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/toc/17503841/2004/69/5>

82. Tanaka A, Ito H, Tanaka R, Yoshida K, Okada K. 1998. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. [Internet]. Plant biology 95: 12719- 12723. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.pnas.org/content/pnas/95/21/12719.full.pdf>

83. Fukusumi T, Matsuda K, Mizoguchi T, Miyatake T, Ito S, Ikeda T, Tamiaki H, Oba T. 2012. Non enzymatic conversion of chlorophyll a into chlorophyll d in vitro: a model oxidation pathway for chlorophyll d biosynthesis. [Internet]. FEBS Letters 586: 2338-2341. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22659188/>

84. Xu M, Kinoshita Y, Tamiaki H. 2014. Synthesis of chlorophyll-*f* analogs possessing the 2- formyl group by modifyng chlorophyll- *a*. [Internet]. Bioorganic & medicinal chemistry letters 24(16): 3997- 4000. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960894X14006507>

85. Ambati R, Gogisetty D, Gokare R, Ravi S, Bikkina P, Bo L, Yuepeng S. 2018. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: current trends and

future prospects. [Internet]. *Critical reviews in food science and nutrition* 59(12): 1880-1902. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1432561>

86. Mimouni V, Ulmann L, Pasquet V, Mathieu M, Picot L, Bougaran G, Cadoret J, Morant A, Schoefs B. 2012. The potential of microalgae for the production of bioactive molecules of pharmaceutical interest. [Internet]. *Current pharmaceutical biotechnology* 13(15): 2733-2750. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23072388/>

87. Maroneze M, Zepka L, Lopes E, Gálvez A, Roca M. 2019. Chlorophyll oxidative metabolism during the phototrophic and heterotrophic growth of *Scenedesmus obliquus*. [Internet]. *Antioxidants* 8(12): 600. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6943719/>

88. Antonaru L, Cardona T, Larkum A, Nurnberg D. 2020. Global distribution of a chlorophyll f cyanobacterial marker. [Internet]. *The ISME Journal* 1(3):1-13. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41396-020-0670-y>

89. Freitas S, Silva N, Sousa M, Ribeiro T, Rosa F, Leao P, Vasconcelos V, Reis M, Urbatzka R. 2019. Chlorophyll derivatives from marine cyanobacteria with lipid reducing activities. [Internet]. *Marine drugs* 17(4): 229. [Citado 10 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6520785/#B30-marinedrugs-17-00229>

90. Chen M, Hernandez M, Loughlin P, Li Y, Willows R. 2019. Genome and proteome of the chlorophyll *f* producing cyanobacterium *Halomicronema hongdechloris*: adaptative proteomic shifts under different light conditions. [Internet]. *BMC genomics* 29(1): 207. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6416890/>

91. Chernomorshy S, Segelman A, Poretz R. 1999. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. [Internet]. *Teratogenesis*,

carcinogenesis and mutagenesis 19(5): 313-322. [Citado 11 de Agosto 2020].

Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10495448/>

92. Vogel J, Termont D, Lieshout E, Katan M, Meer R. 2005. Green vegetables, red meat and colon cancer: chlorophyll prevents the cytotoxic and hyperproliferative effects of haem in rat colon. [Internet]. Carcinogenesis 26(2):387-393. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15550456/>

93. Thiagarasaiyar K, Hing B, Jeon Y, Yen Y. 2020. Algae metabolites in cosmeceutical: an overview of current applications and challenges. [Internet]. Marine drugs 18(6): 323. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7344841/>

94. Shin J, Kim J, Pak K, Kang J, Kim T, Lee S, *et al.* A combination of soybean and *Haematococcus* extract alleviates ultraviolet B induced photoaging. [Internet]. International Journal of molecular science 18(3): 682. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5372692/>

95. Kraatz M, Whitehead T, Cotta M, Berhow M, Rasmussen M. 2014. Effects of chlorophyll derived efflux pump inhibitor pheophorbide *a* and pyropheophorbide *a* on growth and macrolide antibiotic resistance of indicator and anaerobic swine manure bacteria. [Internet]. International journal of antibiotics 2014: 1-14. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijan/2014/185068/>

96. Córdoba N, Acero N, Duque L, Jiménez L, Serna J. 2015. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. [Internet]. UGCiencia 21, 73-82. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/303953105_Obtencion_y_caracterizacion_de_astaxantina_de_la_microalga_Haematococcus_pluvialis

97. Sosa I, Sánchez J. 2004. Espectrofotometría de absorción. [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de México. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf

98. Universidad Nacional Autónoma de México. [Internet]. México: Facultad de química [actualizado diciembre de 2007; citado 11 agosto 2020]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf
99. Córdova M. 2013. Validación de la metodología analítica para la cuantificación de oxitetraciclina clorhidrato en plasma de truchas (*oncorhynchus mykiss*) por cromatografía líquida de alta eficiencia. [Internet]. Universidad Austral de Chile. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcc796v/doc/fcc796v.pdf>
100. Quattrocchi O, Andrizzi S, Laba R. Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Buenos Aires: Artes Gráficas Farro S.A; 1992. [Citado 11 de Agosto 2020]. Disponible en: <https://doku.pub/documents/introduccion-a-la-hplc-aplicacion-y-practica-o-a-quattrocchi-s-a-de-andrizzi-r-f-laba-5lwod9wy4eqj>
101. Zhu Y, Zhang Z, Xu X, Cheng J, Chen Stian J, *et al.* 2020. Simultaneous promotion of photosynthesis and astaxanthin accumulation during two stages of *Haematococcus pluvialis* with ammonium ferric citrate. [Internet]. Science of the total environment, 150 (1): 141689. [Citado 7 de septiembre 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2163/science/article/pii/S0048969720352189>
102. Mascia F, Girolomoni L, Alcocer M, Bargigia I, Perozeni F, Cazzaniga S. *et al.* 2017. Functional analysis of photosynthetic pigment binding complexes in the green alga *Haematococcus pluvialis* reveals distribution of astaxanthin in Photosystems. [Internet]. Scientific reports, 7: 16319. [Citado 7 de septiembre 2020]. Disponible en: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/docview/1968049289?pq-origsite=summon>