

Efecto de los factores de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz sobre la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*

Integrantes:

Kelin Johana Cuero Amú
Jayveri Astrid Domínguez Castillo
Karen Danitza Espitia Sánchez
Laura Andrea Fuentes Cañón

Asesora:

Judith Elena Camacho Kurmen
Química Farmacéutica
EsP. MSc. Dr. en Biociencias

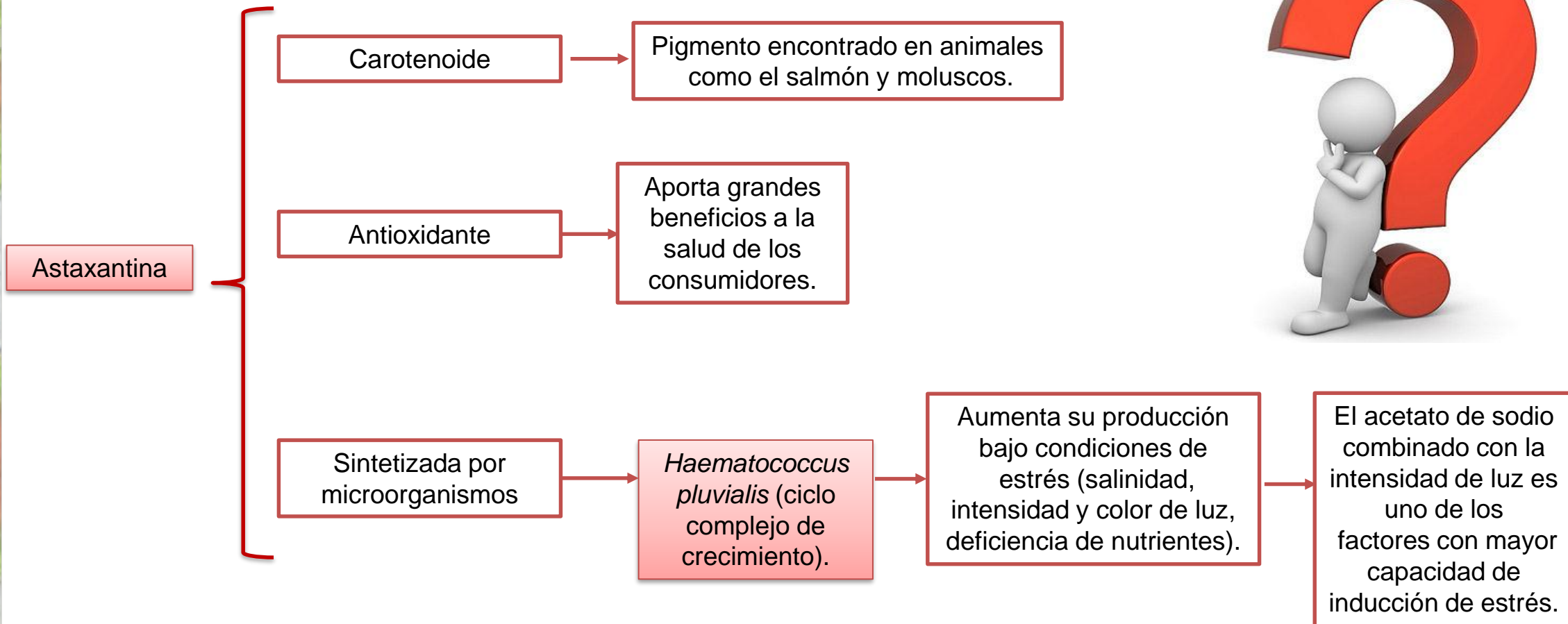
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Bacteriología y Laboratorio Clínico



Universidad de
La Sabana



Introducción



Objetivos

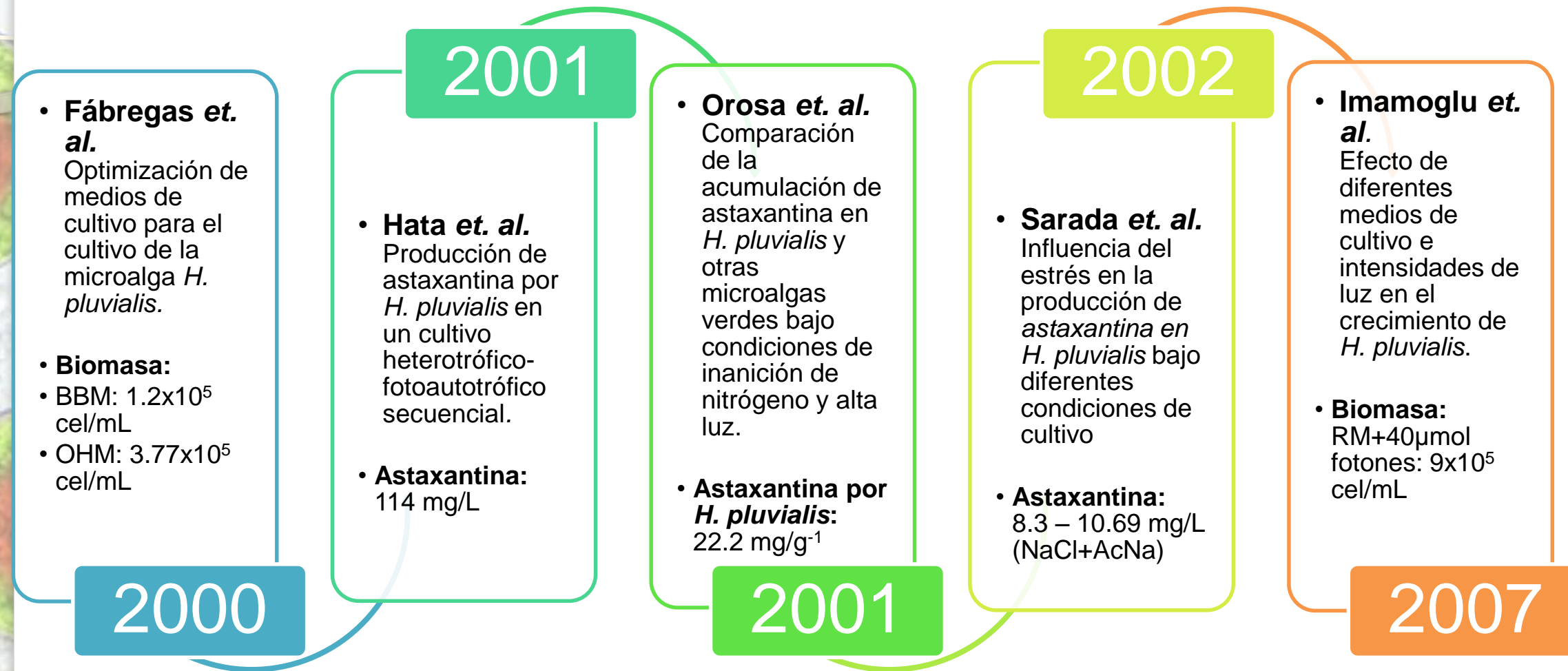
Objetivo general

- ❖ Establecer el efecto del factor de estrés acetato de sodio, alta irradianza y color de luz sobre la producción de astaxantina en *H. pluvialis*.

Objetivos específicos

- ❖ Evaluar el crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM, bajo el efecto de las condiciones de crecimiento y factores de estrés ensayados.
- ❖ Determinar la producción de astaxantina y clorofila en el cultivo y su relación con la concentración de acetato de sodio, alta irradianza y color de luz.
- ❖ Establecer el cambio morfológico de *H. pluvialis* presentado durante el tiempo de cultivo, bajo los efectos de los factores de estrés ensayados.

Antecedentes



Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

- **Vidhyavathi et. al.**
Regulación de la expresión de genes biosintéticos de carotenoides y acumulación de carotenoides en el alga verde *H. pluvialis* bajo condiciones de estrés.

- Aumento de expresión de genes
- **Astaxantina:**
NaCl+AcNa:
24.5 mg/g⁻¹

2008

2009

- **Imamoglu et. al.**
Influencia de diferentes factores de estrés y alta intensidad de luz en la acumulación de astaxantina en el alga *H. pluvialis*.

- **Astaxantina:**
RM libre de nitrógeno:
aumento el 25.5%

- **Niño et. al.**
Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de la microalga *H. pluvialis*.

- **Astaxantina:**
RM +
0.310mg/mL de AcNa: 8.3 µg/mL
- **Biomasa:**
-BBM: 3.88x10⁵ cel/mL
-RM: 7.55x10⁵ cel/mL

2015

2016

- **Zhang et. al.**
Un nuevo paradigma para la producción de astaxantina de la microalga unicelular *H. pluvialis*.

- **Astaxantina:**
AcNa sin Nitrato:
10.5mg/L/día

- **Ruijuan et. al.**
La luz azul aumenta el metabolismo de la biosíntesis de astaxantina y la eficiencia de extracción en *H. pluvialis* mediante la inducción de la germinación del hematoquiste.

- **Astaxantina:**
Luz azul:
aumenta de 4 (L.B) a 6.7 (L.R) veces la producción

2018

Introducción

Objetivos

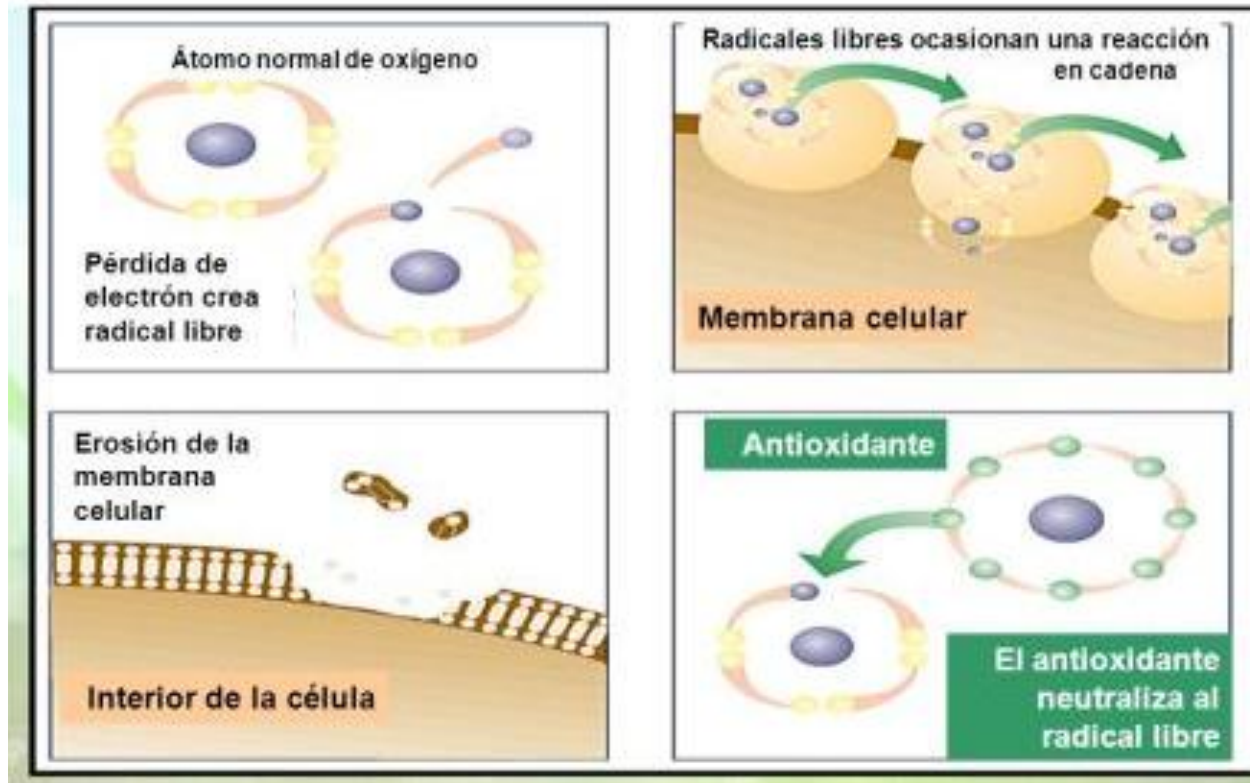
Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

MARCO TEÓRICO

Estrés oxidativo y antioxidantes



Fuente: Rojas P. 2016

ANTIOXIDANTES

- Vitamina C
- Vitamina E
- Betacaroteno
- Superóxido dismutasa
- Catalasa
- Glutatió peroxidasa

- Envejecimiento
- Alzheimer
- Parkinson
- Diabetes
- Artritis reumatoide
- Cáncer
- Arteriosclerosis

PREVENCIÓN

Corrales L et. Al. 2012; Solari S et.al. 2011; Mayor R et.al. 2010

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Astaxantina

Poder antioxidante:

- 38 veces > Betacaroteno
- 500 veces > Vitamina E

Zhang Z *et.al.* 2016

Efecto:

- Fotoprotector
- Inmunomodulador
- Antiinflamatorio

Steinbrenner J. *et.al.* 2001



Fuente: Ambati RR, Phang SM, Ravi S *et.al.* 2014. Suhm Hyung Kim and Hyeyoung Kim *et.al.* 2018 .

Introducción

Objetivos

Metodología


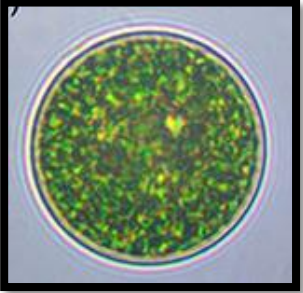
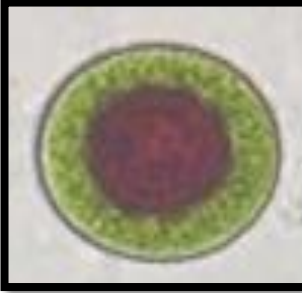

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Haematococcus pluvialis



Ciclo de vida y Morfología celular

FLAGELADA	PALMELLA	CÉLULA INTERMEDIA	QUISTE O APLANOSPORA
			

Fuente: Elaborada por autoras.

Martínez S. 2008; Dong S. *et al.* 2018; Mahfuzur RS *et. al.* (2016)

Introducción

Objetivos

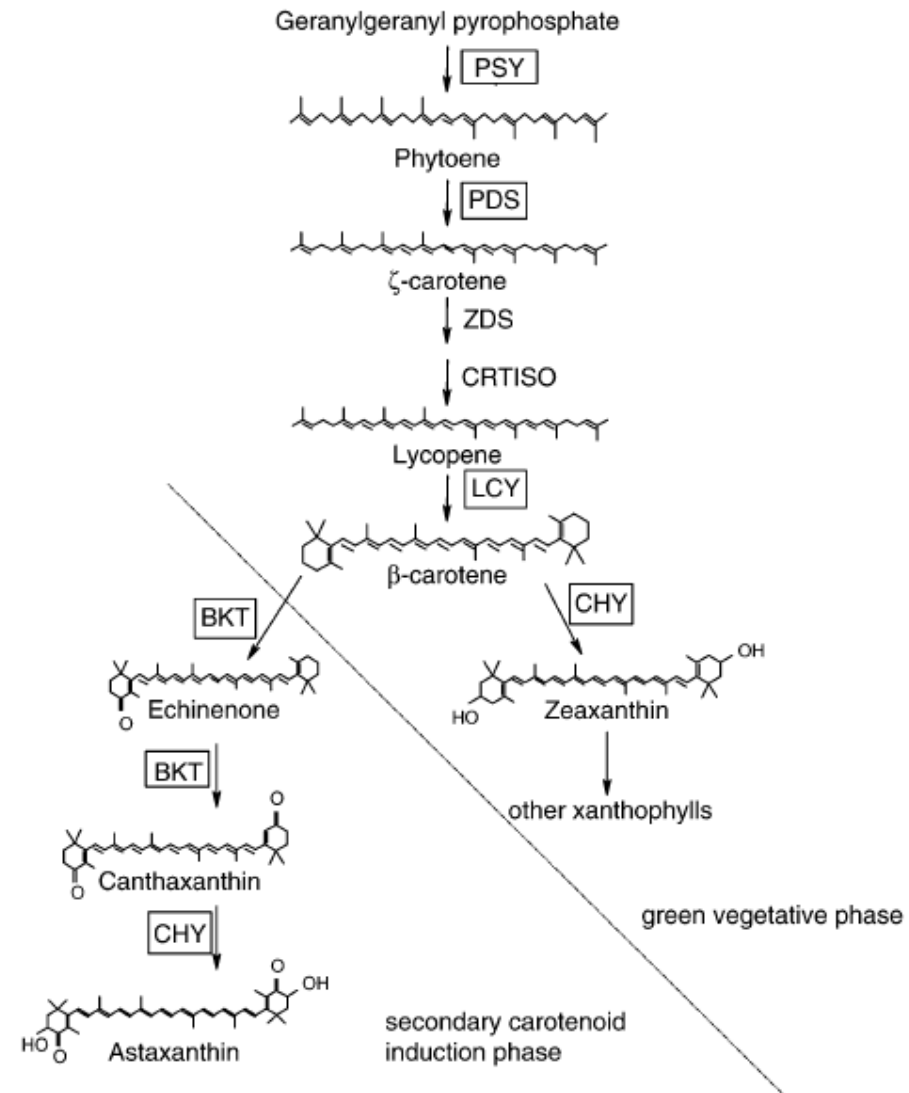
Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Biosíntesis de astaxantina por *H. pluvialis*

PSY: fitoeno sintasa
PDS: fitoeno desaturasa
LCY: Licopeno B-ciclasa
BKT: B-caroteno ketolasa
CHY: B-caroteno Hydrolasa



Fuente: Vidhyavathi *et al.* 2008

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Factores que afectan el crecimiento de *H. pluvialis*

pH: 6 a 9 (8.2 óptimo)

T: 20 a 24°C

CO₂: 0.5% a 6%

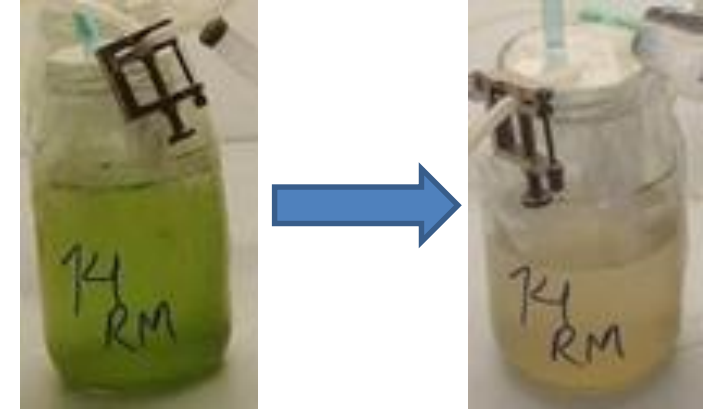
Luz: blanca, roja y azul. Intensidad de luz

Nitrógeno y fosfato

Salinidad: **Acetato de sodio**

Medios de cultivo: **BBM, RM y MES-Volvox**

Metabolismo **mixotrópico**



Fuente: Fotos tomadas por autoras.

Fernandez *et.al.* 2017; Benavente *et. al* 2014; Córdoba *et. al.* 2015; Khanam *et. al.* 2016; Bravo *et. al.* 2008; Granada *et. al.* 2015; Camacho *et. al.* 2015

Introducción

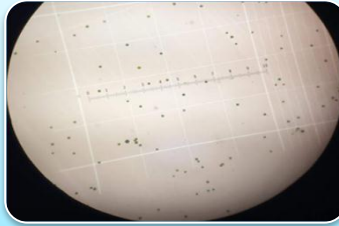
Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Medición del crecimiento de *H. pluvialis* y producción de clorofila y astaxantina



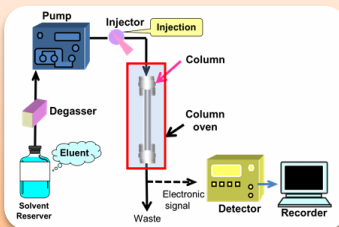
Crecimiento celular de *H. pluvialis*

- Hemocitómetro
- Densidad óptica
- Peso seco



Extracción de pigmentos

- Solventes orgánicos: metanol, acetona, éter, cloroformo.



Cuantificación

- Espectrofotometría
- HPLC

Cordoba *et.al.* 2015; Masojidek *et. al* 2014.

Introducción

Objetivos

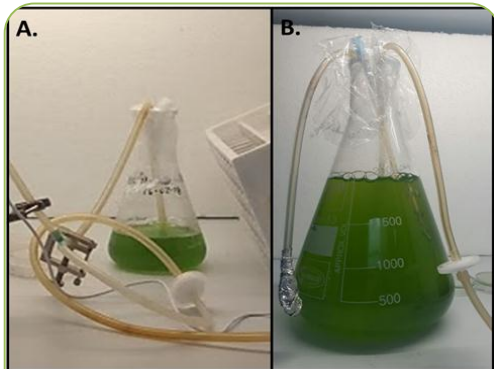
Metodología

Resultados y discusión

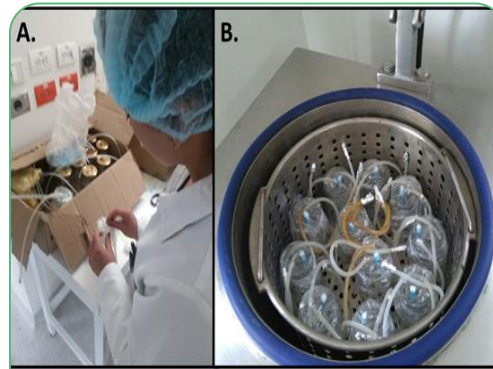
Conclusiones y recomendaciones

Diseño Metodológico

Fase I: Evaluación del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM.



Preparación del inóculo de *H. pluvialis* UTEX 2505



Preparación de biorreactores



Inoculación en BBM y RM por triplicado



Cinética de crecimiento

Fuente: Fotos tomadas por autoras.

Condiciones de cultivo: Irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo de 16:8 LO, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, medios MES-Volvox, RM y BBM, luz blanca y agitación por burbujeo continuo.

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

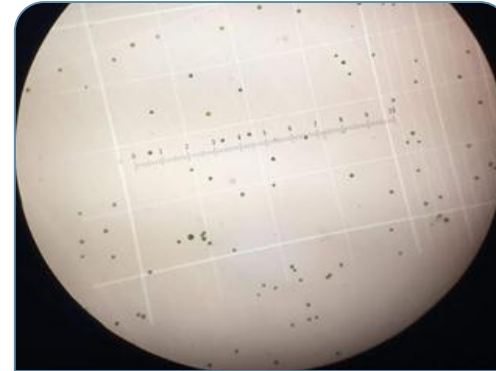
Fase I: Evaluación del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM.



Toma de muestra



Almacenamiento de muestras



Conteo en cámara de Neubauer



Morfología de *H. pluvialis*.

Fuente: Fotos tomadas por autoras.

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Número de Células} \times 10000}{\text{Número de cuadrantes} \times \text{dil.}}$$

Introducción

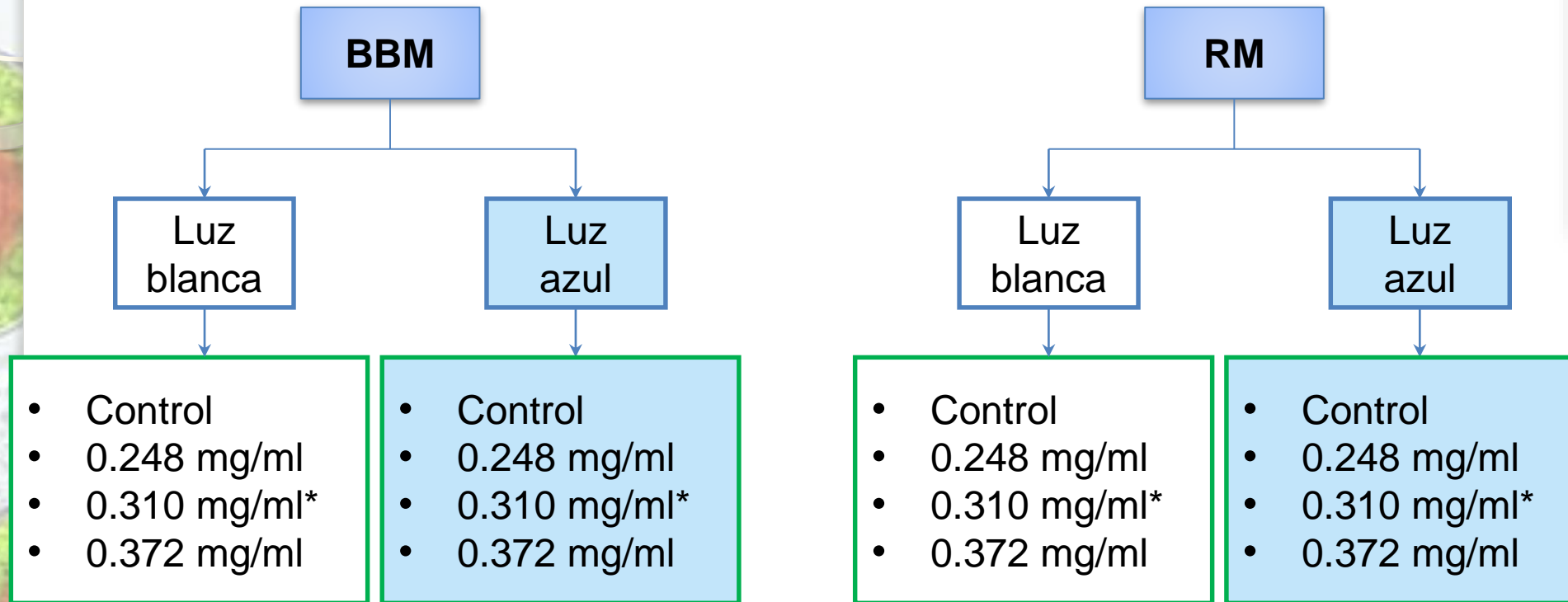
Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila: inducción de estrés



Fuente: Foto tomada por autoras

□ Concentraciones de acetato de sodio

*Niño *et. al.* (2015)

Condiciones de cultivo: Irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo de 20:4 LO, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y agitación por burbujeo continuo.

Introducción

Objetivos

Metodología

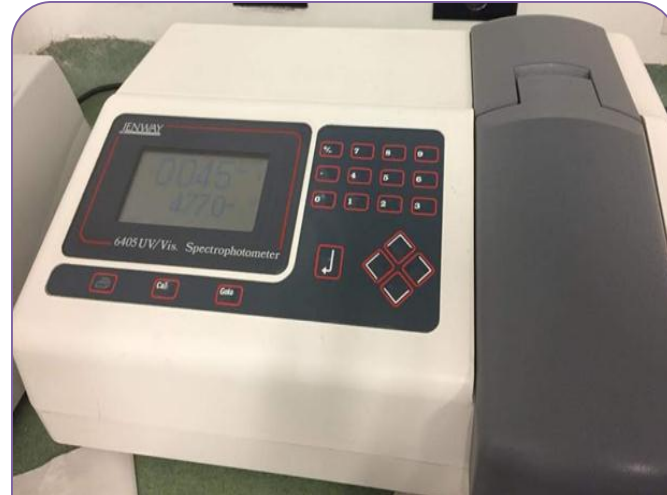
Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila: Inducción de estrés



Extracción de astaxantina y clorofila con metanol 90% (APHA, 1992)



Cuantificación de clorofila (667 nm) y astaxantina (477 nm)
Curvas de calibración



Análisis estadístico: ANOVA (95%) Graph Pad prism 7.0

Fuente: Fotos tomadas por autoras.

Hernández E *et al.* 2011

Introducción

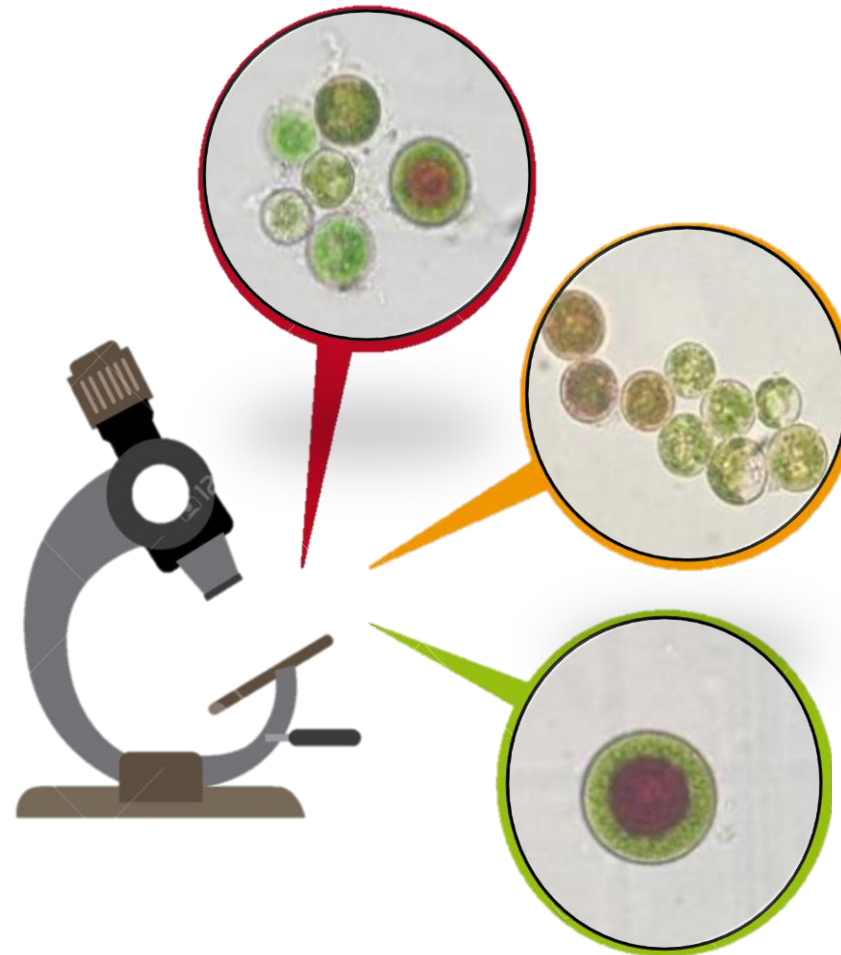
Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Fase III: Establecimiento del cambio morfológico presentado durante el tiempo de cultivo, bajo el efecto de los factores de estrés ensayados.



Fuente: Fotos tomadas por autoras.

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y
recomendaciones

Resultados y discusión

Fase I: Evaluación del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM.



Recuento final del inóculo: 4×10^5 cel/mL

Día de ensayo	BBM	RM
3		
6		
9		
12		
15		



Fuente: Fotos tomadas por autoras.

Condiciones de cultivo: Irradianza de $70 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo de 16:8 LO, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, medios, RM y BBM, luz blanca y agitación por burbujeo continuo.

Introducción

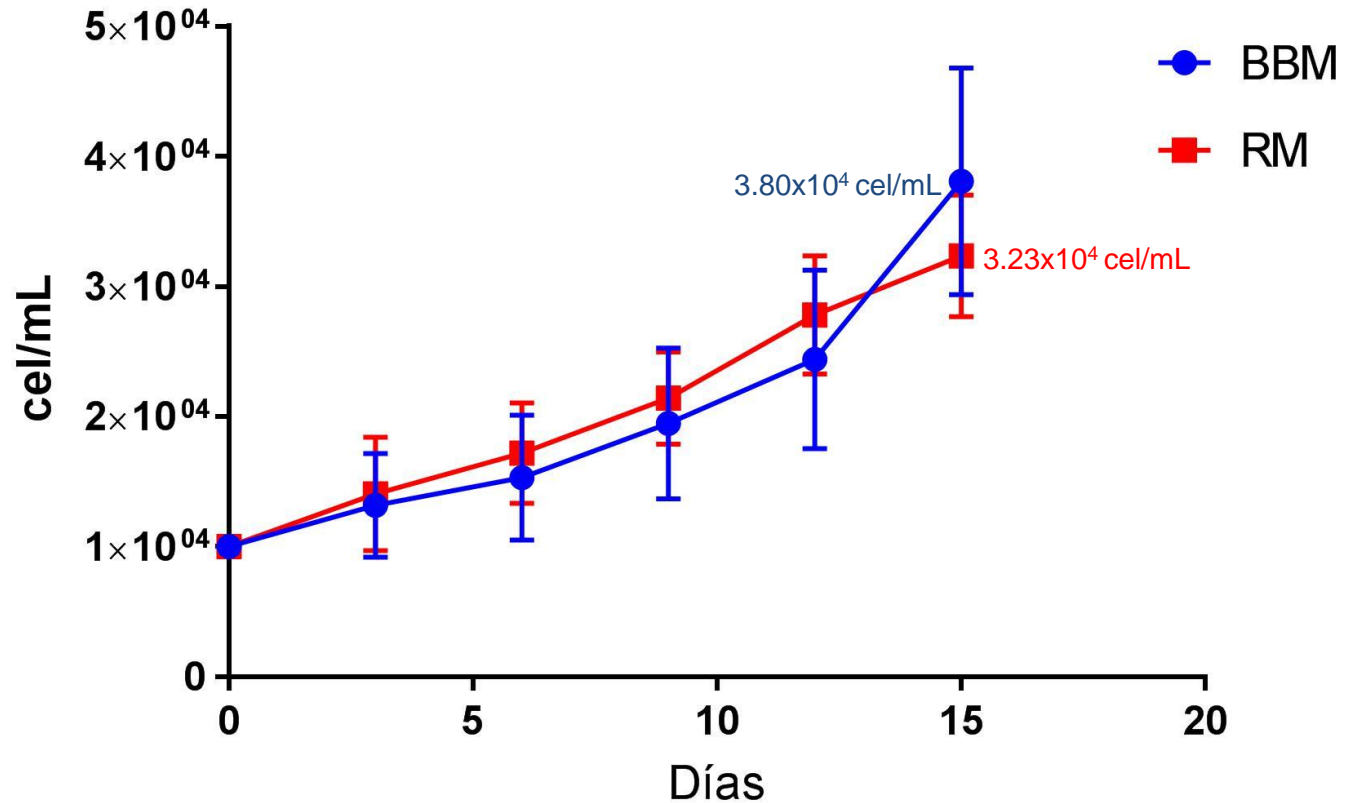
Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Cinética de crecimiento



ANOVA 95% de confianza

F:0.7871

P:0.37

GL:1

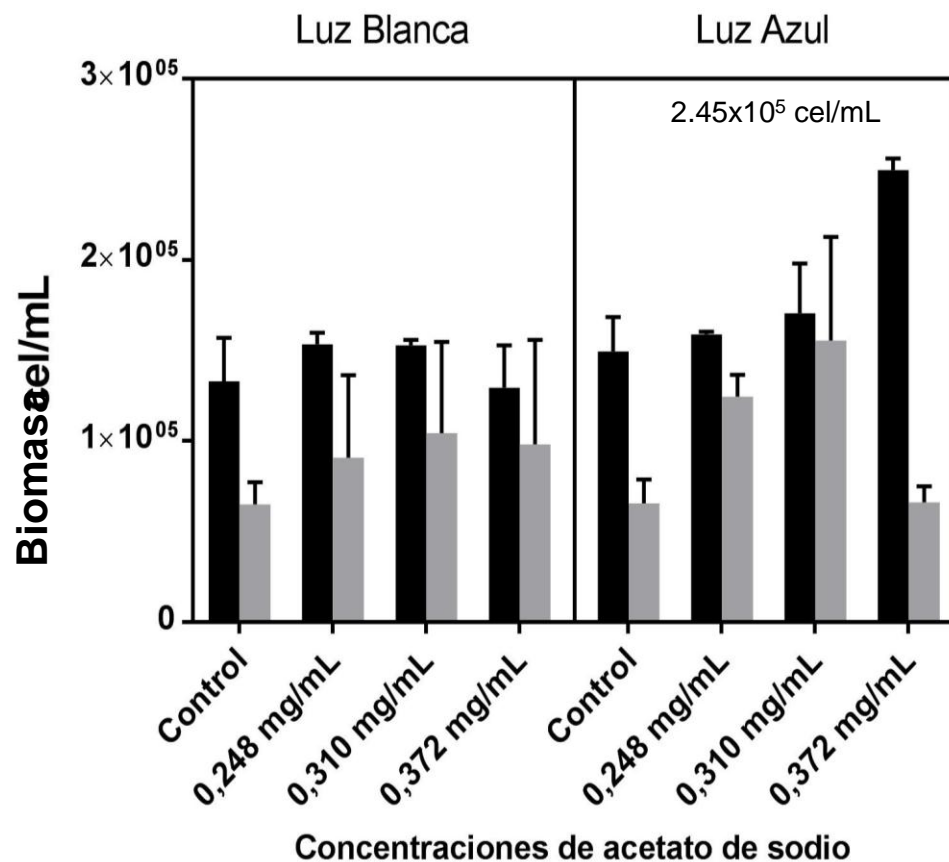
Grafica N° 1: Cinética de crecimiento celular en medios de cultivo RM y BBM durante 15 días.

Fuente: Elaborado por autoras

Medio de cultivo	Velocidad de crecimiento
RM	0.0329 cel/día
BBM	0.0326 cel/día

Fase I: Evaluación del crecimiento celular en los medios de cultivo RM y BBM.

Acumulación de biomasa de todos los tratamientos, obtenidas al día 30 de ensayo.



	Crecimiento promedio luz blanca	Crecimiento promedio luz azul
■ BBM	1.51×10^5 cel/mL	1.98×10^5 cel/mL
■ RM	0.89×10^5 cel/mL	1.03×10^5 cel/mL

ANOVA (95%)	DF	F	P value
Concentración de acetato de sodio	3	3,03	0,0600
Luz	1	6,43	0,0220
Medio de Cultivo	1	39,43	<0,0001

Fuente: Elaborado por autoras

Niño *et al* (2017): BBM- 3.88×10^5 cel/mL y RM- 7.55×10^5 cel/mL/ tiempo mas prologado

Fabregas *et al* (2000): BBM 1.2×10^5 cel/mL

Hata *et al* (2001): Acetato no interviene en biomasa pero si acumulación de AXT

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila: cambio morfológico

BBM

Día	Luz blanca				Luz azul			
	Control	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL	Control	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL
18								
21								
24								
27								
30								

RM

Día	Luz blanca				Luz azul			
	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml	Control	0.248 mg/ml	0.310 mg/ml	0.372 mg/ml
18								
21								
24								
27								
30								

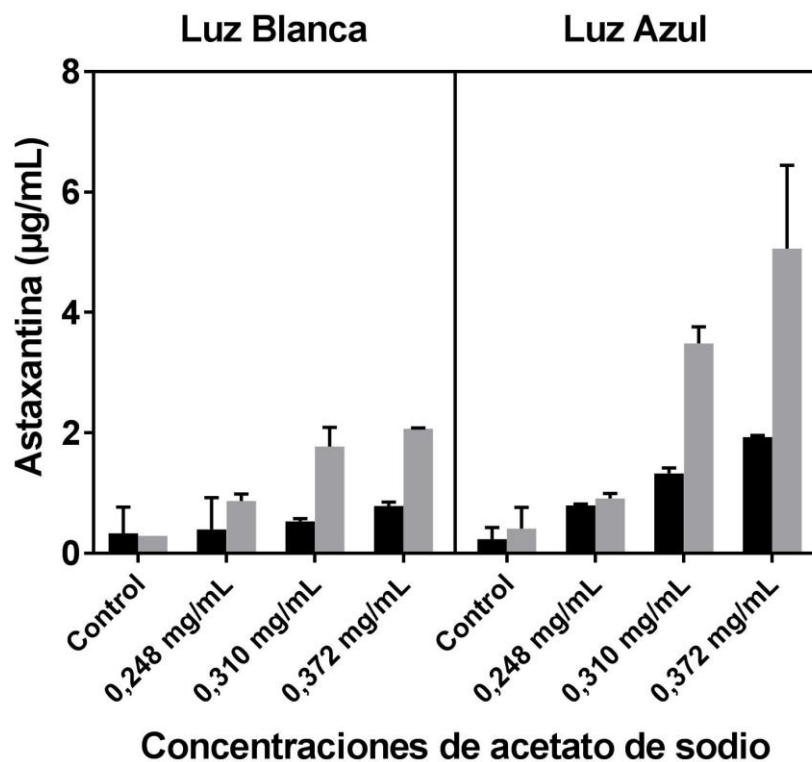
Fuente: Elaborada por autoras.

Condiciones de cultivo: Irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, CO_2 5%, pH 6.8, fotoperiodo de 20:4 LO, temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y agitación por burbujeo continuo.

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila

Concentraciones finales de astaxantina de los tratamientos obtenidas al día 30 de ensayo.

Acumulación de astaxantina



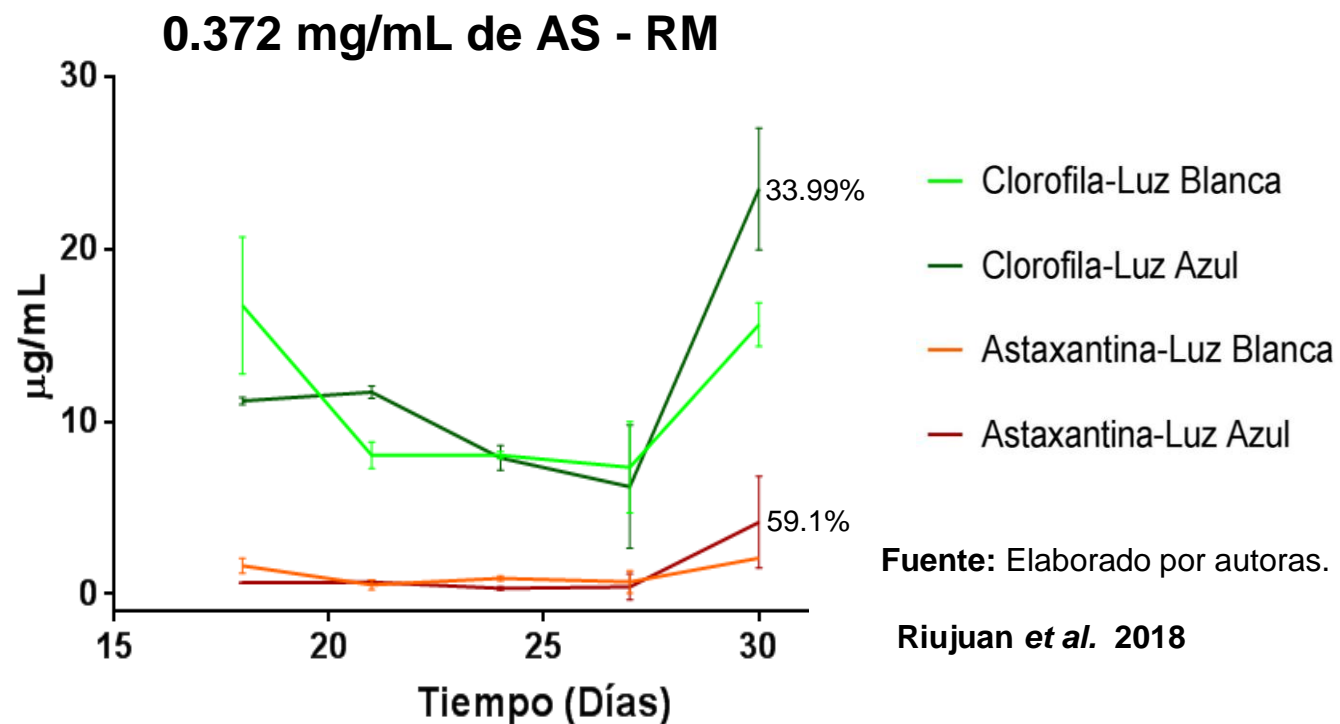
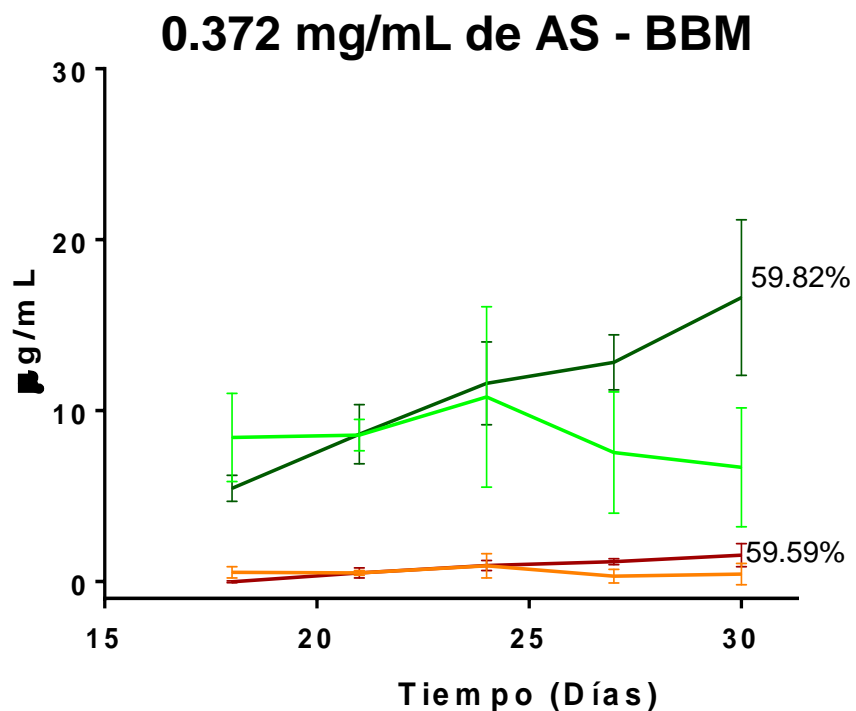
		Luz blanca	Luz azul
■ BBM	Control	0.33 µg/mL	0.23 µg/mL
	0.372 mg/mL AS	0.78 µg/mL	1.93 µg/mL
■ RM	Control	0.29 µg/mL	0.41 µg/mL
	0.372 mg/mL AS	2.07 µg/mL	5.06 µg/mL

AS: acetato de sodio

ANOVA (95%)	DF	F	P value
Concentración de acetato de sodio	3	43,98	<0,0001
Luz	1	36,46	<0,0001
Medio	1	52,74	<0,0001

Riujuan 2018: luz azul mejora germinación
 Niño y Rodriguez 2015: 0.310 mg/mL+RM: 8.3µg/mL
 Sarada y Zhang 2016: acetato de Na

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila



	BBM		RM	
	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
Clorofila luz blanca	8,43 – 10.80	6.67	16.74 – 7.35	15.62
Clorofila luz azul	5.44	16.60	11.19 - 6.23	23.66
Astaxantina luz blanca	0.52 – 0.92	0.78	1.62	2.07
Astaxantina luz azul	0.01	1.93	0.64	5.06

Introducción

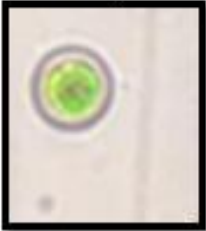





Objetivos

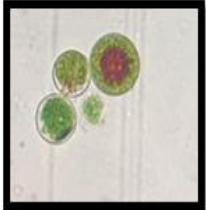
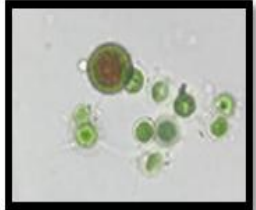
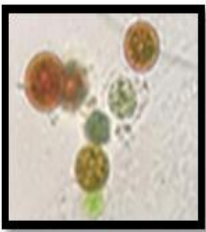

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones

Fase III: Establecimiento del cambio morfológico presentado durante el tiempo de cultivo, bajo el efecto de los factores de estrés ensayados.

Día de muestreo	BBM				RM			
	CONTROL	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL	CONTROL	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL
18								
21								
24								

Día de muestreo	BBM				RM			
	CONTROL	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL	CONTROL	0.248 mg/mL	0.310 mg/mL	0.372 mg/mL
27								
30								

Fuente: Elaborada por autoras.

Irradianza de $150 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y luz azul.

CONCLUSIONES

Se determinó que **no hay diferencias significativas** ($F=0.7871$; $P=0.3761$; $GL=1$) en cuanto a la producción de biomasa durante la etapa de crecimiento exponencial de *H. pluvialis*, hallándose **3.80×10^4 cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0.326 cel/día en el medio BBM y 3.23×10^4 cel/mL con una velocidad de crecimiento de 0.329 cel/día en el medio RM a los 15 días** de cultivo donde las células no se encontraban sometidas a estrés. Sin embargo, se observa que tras la inducción de estrés **el crecimiento en el medio de cultivo BBM** es significativamente mayor ($F=39.43$; $P<0.0001$; $GL=1$) en comparación con el medio RM.

Se estableció que el medio de cultivo BBM fue ideal en la producción de biomasa microalgal, y el **medio RM fue significativamente más eficiente para la producción de astaxantina en 5.06 $\mu\text{g/mL}$** ($F=52.74$; $P<0.0001$; $GL=1$), en el cual se utilizó una concentración a **0.372 mg/mL de acetato de sodio, luz azul e irradianza 150 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como factores de estrés**. En este mismo tratamiento se halló una concentración final de **clorofila de 23.66 $\mu\text{g/mL}$** .

Durante la investigación **se observaron las principales fases morfológicas de *H. pluvialis***; durante la fase de crecimiento se observó que la mayoría de células estaban en **fase vegetativa** debido a las condiciones óptimas del medio de cultivo. Tras la inducción de estrés con acetato de sodio, alta irradianza y luces blanca y azul, las células iniciaron un **proceso de enquistamiento (palmella)** aproximadamente a los 6 días de inducción y la posterior acumulación de astaxantina dando lugar a **aplanosporas** de tamaño aumentado y pared celular gruesa.

Los factores de estrés empleados en la investigación en forma combinada de acetato de sodio, alta irradianza y luz azul produjeron astaxantina en *H. pluvialis* en especial cuando se uso el medio de cultivo RM.

Recomendaciones

Se recomienda un tiempo de crecimiento más largo y el uso de los factores de estrés seleccionados por la mayor producción de astaxantina.

Se sugiere el uso de la cromatografía líquida de alta resolución para analizar el contenido del carotenoide.

Es importante realizar el estudio de la expresión de genes implicados en la síntesis de astaxantina bajo estos factores inductores de estrés.

Se recomienda realizar el escalamiento a biorreactores del cultivo de *H. pluvialis* bajo los efectos de estrés ensayados en esta investigación.

Participación en eventos



ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

LA OFICINA DE INVESTIGACIONES

Certifica que :


JAYVERI ASTRID DOMÍNGUEZ CASTILLO

Del semillero:

BIOPROCESOS Y CONTROL

Participó como **PONENTE** en el VII Encuentro Institucional de Semilleros de Investigación realizado el 26 septiembre del año 2017.

Myriam Sepúlveda L.
Myriam Sepúlveda López
Jefe de la Oficina de investigaciones



SOCIEDAD COLOMBIANA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Los organizadores del III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular - C2B2

Certifican que el trabajo titulado: "Efecto de los factores de estrés acetato de sodio y luces sobre la producción de astaxantina en Haematococcus pluvialis" fue presentado por Domínguez Castillo J, Espitia Sanchez K, Fuentes Cañon L, Cuero Amu K, Camacho Kurmen J

En modalidad póster en el área temática de Biotecnología & Microorganismos durante el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 llevado a cabo en la ciudad de Bogotá, Colombia del 1 al 3 de Noviembre de 2018.

Patricia del Portillo
Patricia del Portillo
Presidenta Comité Científico C2B2



18 CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGIA CNB-COLOMBIA

Certifica que

LAURA ANDREA FUENTES CAÑON
CC 1030672103

Participó como Asistente

En el 18º CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGIA CNB-COLOMBIA que se llevo a cabo del 09 al 12 de noviembre de 2018 en la ciudad de Barranquilla, con una intensidad horaria de 28 horas.

Stella Paz de Bolívar
STELLA PAZ DE BOLIVAR
Presidenta CNB - Colombia

Eva Blanco de Rozco
EVA BLANCO DE ROZCO
Presidenta 18º Congreso CNB - Colombia

Sonia Rojas López
SONIA ROJAS LÓPEZ
Coordinadora Comisión Educativa 18º Congreso CNB - Colombia

Yennifer de Vargas Uparala
YENIFER DE VARGAS UPARELA
Coordinadora Academia 18º Congreso CNB - Colombia



VIII ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
V ENCUENTRO INSTITUCIONAL DE GRUPOS DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

LA OFICINA DE INVESTIGACIONES

Hace constar que :

KAREN ESPITIA

Con documento: 1030656932

Participó en calidad de **PONENTE** el día 30 enero del año 2019, con una duración de 3 horas.

Claudia Consuelo González Ramírez
Claudia Consuelo González Ramírez
Jefe de Oficina



**EL SUSCRITO COORDINADOR DE LA
RED COLOMBIANA DE SEMILLEROS DE INVESTIGACIÓN
NODO BOGOTÁ - CUNDINAMARCA**

CERTIFICA QUE:

La Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, registrada con el Nit: 800144829- 9, participó en el el XVII Encuentro Regional de Semilleros de Investigación realizado en la Universidad Autónoma de Colombia del 08 al 10 de mayo del 2019, con los estudiantes y/o docentes relacionados a continuación:

105	ALISON CAMILA RUEDA LONDOÑO	1000804016	Ponente
106	ANNE MICHELLE GUARÍN PINTO	1010244812	Ponente
107	SARA RAMÍREZ MARTÍNEZ	10026301581	Ponente
108	MONICA NATALIA GUEVARA PINTO	1024598709	Ponente
109	SHIRLEY PAOLA CARREÑO SOTO	1018492984	Ponente
110	LAURA ALEJANDRA URIBE GONIMA	1022430751	Ponente
111	KELIN JOHANA CUERO AMU	1023955785	Ponente
112	JAYVERI ASTRID DOMÍNGUEZ CASTILLO	1073717698	Ponente
113	YULIETH ALEJANDRA CASTAÑEDA	1233496858	Ponente

Se expide la presente a solicitud del (de la) interesado (a) a los veintiún (21) días del mes de mayo del año dos mil diecinueve 2019.

GERMAN EDUARDO VARGAS ZAPATA
Coordinador
RedColsi Nodo Bogotá – Cundinamarca



Agradecimientos

A nuestros padres y familiares por su paciencia y apoyo a lo largo de nuestra carrera universitaria.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Semillero de Bioprocesos y Control y Universidad de la Sabana.

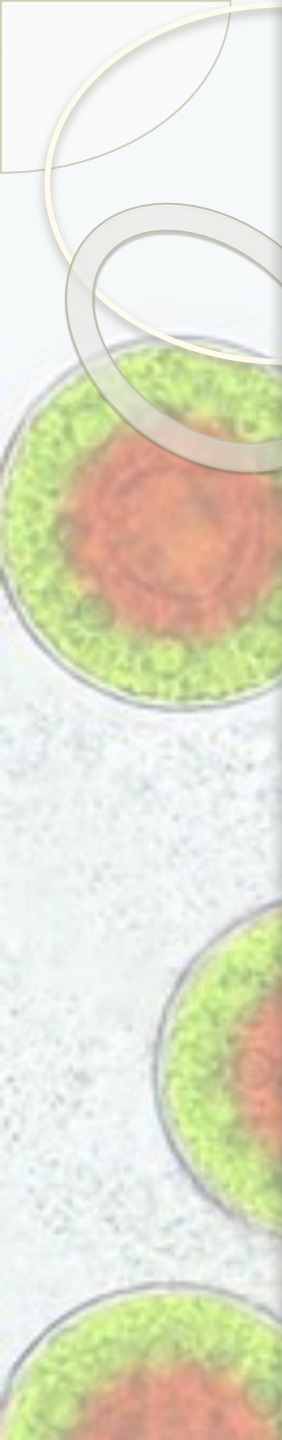
A nuestra asesora la Doctora Judith Elena Camacho Kurmen, Doctor Jorge Alberto Rodriguez Orejuela y Doctor Luis Eduardo Diaz, por permitirnos aprender y guiarnos en esta investigación

Agradecemos a nuestros jurados profesora Yalile López, Liliana Muñoz y Carolina Jaime por su tiempo y sugerencias a nuestro proyecto.

Bibliografía

- ¹ Nguyen KD. Astaxanthin: A Comparative Case of Synthetic VS. Natural Production. Chemical and Biomolecular Engineering [Internet]. 2013 [citado 2018 agosto 20]; Available in: https://www.researchgate.net/publication/305150785_Astaxanthin_a_comparative_case_of_synthetic_vs_natural_production
- ² Camacho JE, González G, Klotz B. Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo diferentes condiciones de estrés. NOVA [Internet]. 2013 [citado 2017 oct 7];11(19):94-103 Disponible en:<http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/nova/article/view/1022/1019>
- ³ Ambati RR, Phang SM, Ravi S, et al. astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications--a review. Mar drugs [Internet]. 2014[citado 2018 abril 19];12(1), 128-152 Available in: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/1/128/htm>
- ⁴ Fernández J, Oterino AG, Alonso GG, Flores JA y Turrado JP. Presencia de *Haematococcus pluvialis* (Flotow, 1844) en la provincia de Zamora (Haematococcaceae). Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol. [Internet] 2015 [citado 2018 abril 23]; 149, 101-107. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779903000787>
- ⁵ Martínez S. Evaluación del crecimiento celular y de los pigmentos obtenidos de la microalga *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYTA: VOLVOCALES) cultivada en diferentes medios.[Trabajo de grado de para obtener el título de doctora en tecnología avanzada] [Internet] 2011 Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional., México, D.F., págs. 103. [citado 2018 Abril 19] Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8226/EVALCREC.pdf?sequence=1>.
- ⁶ Kiperstok AC, Sebestyén P, Podola B, Melkonian M. Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities. Algal Research [Internet] 2017 [citado 2018 abril 24]; 213-222 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641630594X>
- ⁷ Makio K, Toshihide K and Shiro N. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga, *Haematococcus pluvialis* Appl Environ Microbiol [Internet] 1993 [citado 2018 abril 24];59(3): 867-73. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202201/>
- ⁸ Orosa M, Valero JF, Herrero C, et al. Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. Biotechnology Letters [Internet].2001 [citado 2018 abril 22];23 (13), 1079-85 Available in: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1010510508384>
- ⁹ Steinbrenner J and Linden H. Regulation of Two Carotenoid Biosynthesis Genes Coding for Phytoene Synthase and Carotenoid Hydroxylase during Stress-Induced astaxanthin Formation in the Green Alga *Haematococcus pluvialis*. Planta Physio [Internet].2001 [citado 2018 abril 22];125 (2): 810 - 17 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC64882/>

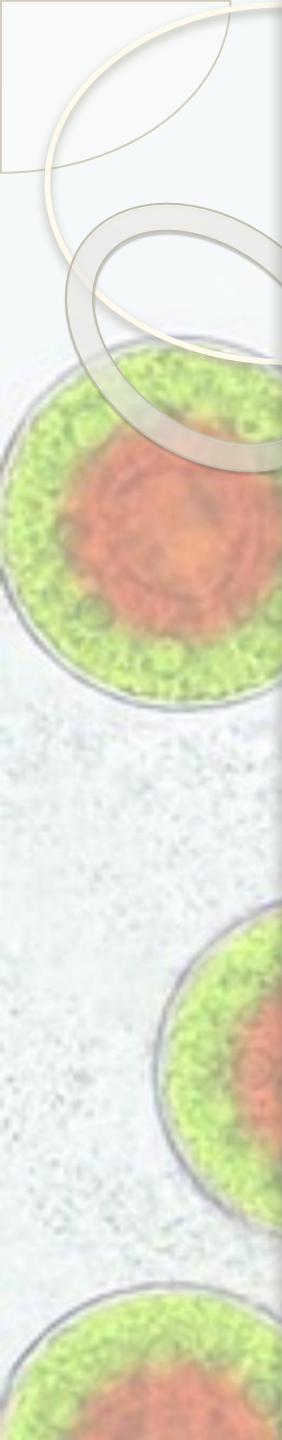
- 
- ¹⁰ Sarada R, Tripathi U and Ravishankar GA. Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. Process Biochemistry [Internet].2002 [citado 2018 abril 22];37 (6): 623-27 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201002461>
 - ¹¹ Orosa M, Franqueira D, Cid A and Abalde J. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. Bioresource Technology [Internet].2005 [citado 2018 abr 2]; (96) 373–378 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852404001476>
 - ¹² Jeon Y, Cho C and Yun Y. Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga *Haematococcus pluvialis*. Enzyme and Microbial Technology [Internet].2006 [citado 2018 marz 29]; (39) 490–495 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022906001098?via%3Dihub>
 - ¹³ Imamoglu E, Vardar F and Conk M.. Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*. International Journal of Natural and Engineering Sciences [Internet]. 2007 [citado 2018 abril 22]; 1 (3): 05-09 Available in: https://www.researchgate.net/publication/284261435_Effect_of_different_culture_media_and_light_intensities_on_growth_of_Haematococcus_pluvialis
 - ¹⁴ Vidhyavathi, Venkatachalam and Sarada. Regulation of carotenoid biosynthetic genes expression and carotenoid accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* under nutrient stress conditions. J Exp Bot [Internet].2008 [citado 2019 marz 25];59(6):1409-18. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343887>
 - ¹⁵ Imamoglu E, Dalay MC and Sukan FV. Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*.New Biotechnology [Internet]. 2009 [citado 2018 abril 22]; 26 (3): 199-204 Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712763>
 - ¹⁶ Su Y, Wang J, Shi M, et al. Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. Bioresource technology [Internet]. 2014 [citado 2019 marz 10]; 26 170:522-529 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164345>
 - ¹⁷ Chekanov K, Lobakova E, Selyakh I, et al. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). Marine drugs [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 4]; 12(8):4504-20. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196836>
 - ¹⁸ Dong, Huang, Zhang, et al. Four different methods comparison for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*.The Scientific World Journal [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 4]; 7 Available in: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/694305/>
 - ¹⁹ Wan, Zhang, Hou, et al. The effect of temperature on cell growth and astaxanthin accumulation of *Haematococcus pluvialis* during a light–dark cyclic cultivation. Bioresource Technology [Internet]. 2014 [citado 2018 sep 2] ;167 :276-283 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414008748>
 - ²⁰ Chen G, Wang B, Han D, et al. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) [Plant J.](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.03.010) [Internet]. 2015 [citado 2019 marz 10] ; 81(1):95-107 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25353310>
 - ²¹ Zhengquan G, Yan L, Guanxun W, et al. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: Astaxanthin Induction by Salicylic Acid (SA) and Jasmonic Acid (JA). PLoS One [Internet]. 2015 [citado 2018 sep 3] ; 10(10) Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4979887/>

- 
- ²² Hernández KJ, Pérez ME, Romo CJ, Alcatran LA, Hurtado LA. Condiciones de producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis*: Revisión bibliográfica 2003-2013. Rev Mex Cienc Farm [Internet]. 2015 [citado 2017 oct 8]; 46 (1): 7-16. Available in: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57946147002.pdf>
 - ²³ Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, et al. astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Prevents Oxidative Stress on Human Endothelial Cells without Toxicity. Mar drugs [Internet]. 2015 [citado 2018 abril 19]; 13(5): 2857–2874 Available in <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446609/>
 - ²⁴ Zhang Z, Wang B, Hu Q, et al. A new paradigm for producing astaxanthin from the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis*. Biotechnology and Bioengineering [Internet]. 2016 [citado 2019 marz 29]; 3(10):2088-99 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27563850>
 - ²⁵ Pan-utai W, Parakulsuksatid P and Phomkaivon N. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology [Internet]. 2017. [citado 2019 marz 25]; (12) 152-158 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818117304619#bib16>
 - ²⁶ Castillo CM, Rivera FC, Díaz AG. Evaluation of Cell Growth Conditions for the astaxanthin Production as and of *Haematococcus pluvialis* Microalgae. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; [Internet] 2017 [citado 2019 ener 19]. Available in: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n28/1794-2470-nova-15-28-00019.pdf>
 - ²⁷ Sun H, Liu B, Lu X, Cheng KW, Chen F Anonymous Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. Bioresour Technol. [Internet] 2017 [citado 2018 mar 30] 233:326-331. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28285225>
 - ²⁸ Bangxiang He, Lulu Hou, Manman Dong, et al. Transcriptome Analysis in *Haematococcus pluvialis*: astaxanthin Induction by High Light with Acetate and Fe²⁺. Int. J. Mol. Sci [Internet] 2018 [citado 2018 mar 30]; 19(1) 175 Available in: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/1/175>
 - ²⁹ Sheng B, Fan F, Huang J, et al. Investigation on models for light distribution of *Haematococcus pluvialis* during astaxanthin accumulation stage with an application case. Algal Research [Internet] 2018 [citado 2018 sep 4]; 33: 182-189 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926417311761>
 - ³⁰ Christian D, Zhang J, Sawdon AJ, et al. Enhanced astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* using high carbon dioxide concentration and light illumination. Bioresour Technol [Internet] 2018 [citado 2018 sep 4]; 256:548-551 Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29482971>
 - ³¹ Kathiresan s, Chandrashekar A, Ravishankar G and Sarada R, Regulation of astaxanthin and its intermediates through cloning and genetic transformation of β -carotene ketolase in *Haematococcus pluvialis*, Journal of Biotechnology [Internet] 2015 [2019 abril 4]; 196–197: 33-41 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165615000152>
 - ³² Constanza L and Muñoz MM. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. NOVA [Internet] 2012 [citado 2018 abril 24]; 10 (18) 135-250 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v10n18/v10n18a08.pdf>

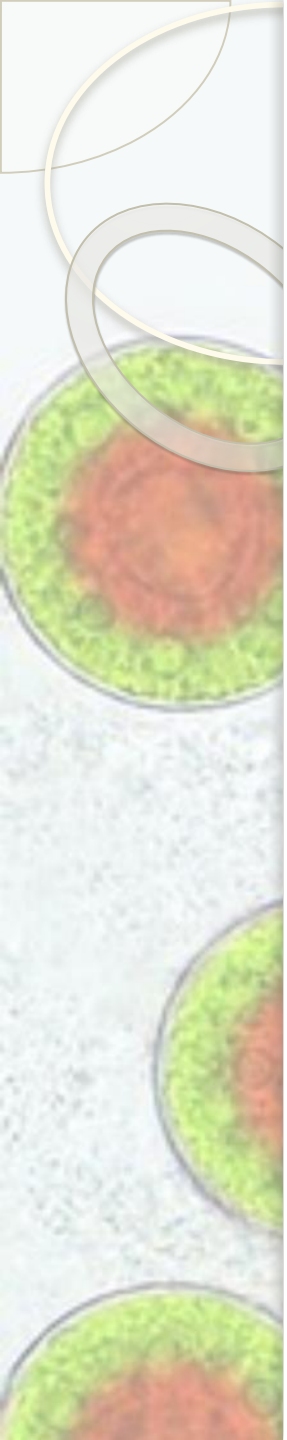
- 
- 33 Solari S, Vilchez J et al. astaxantina: antioxidante de origen natural con variadas aplicaciones en cosmética. Chile: Universidad Arturo Prat; 2011 [citado 2018 mar 30]. Available in: <http://www.unap.cl/admision/carreras/pregrado/2012/images/farmacia/papers/2011-B-1.pdf>
 - 34 Mercola, Investigación sobre la astaxantina demuestra que tiene beneficios significativos en todo el cuerpo [Internet] 2017 [2019 abril 3] Disponible en: <https://articulos.mercola.com/sitios/articulos/archivo/2017/02/20/beneficios-de-la-astaxantina-para-todo-el-cuerpo.aspx>
 - 35 Islam M, Gracia F, los antioxidantes para la salud óptima, Rev méd cient [Internet] 2013 [2019 abril 3]; 26(2): 3-9 Disponible en: https://www.revistamedicocientifica.org/index.php/rmc/article/viewFile/371/pdf_54
 - 36 Mayor R, Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. [Internet] 2010 [citado 2018 abril 24];5(2):23-29 Disponible en:<http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v5n2/v5n2a05.pdf>
 - 37 López P and Mach N. Efecto del consumo de astaxantina en la salud. Revisión. Rev Esp Nutr Comunitaria [Internet] 2012 [citado 2019 ener 23];18(3):164-177 Disponible en:http://www.renc.es/imagenes/auxiliar/files/RENC%202012-3_art%206.pdf
 - 38 Carranco M, Calvo M and Fernandos G, Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. Archivos Latinoamericanos de Nutrición [Internet] 2011 [citado 2019 enero 9];61(3):233-41 Disponible en: <https://www.alanrevista.org/ediciones/2011/3/art-1/>
 - 39 carotenoides [Internet] 2012 [2019 abril 3]; Disponible en: <http://www.sanutricion.org.ar/files/upload/files/carotenoides.pdf>
 - 40 Danxiang H , Yantao L and Qiang H, Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications, Algae [Internet] 2013 [2019 abril 4]; 28(2): 131-147 Available in: https://www.e-algae.org/upload/pdf/ALGAE_28_2_01.pdf
 - 41 Guerin M, Huntley ME and Olaizola M. *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends in Biotechnology [Internet] 2003 [citado 2018 abril 24];21(5):210-6. Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727382>
 - 42 Tominaga K, Hongo N, Karato M and Yamashita E, Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects actabp [Internet] 2012 [2019 abril 3]; 59 (1) 43–47 Available in: http://www.actabp.pl/pdf/1_2012/43.pdf
 - 43 Maquera SL, “EVALUACION DEL EFECTO PIGMENTANTE Y NUTRICIONAL DEL *Haematococcus pluvialis* COMO BIOAGENTE APLICADO EN LA DIETA DE TRUCHAS EN EL CRIADERO C.E.D.E. PEZ PUNO 2014”. [tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica]. AREQUIPA – PERÚ Universidad catolica de Santa Maria 2015 [citado 2018 abril 25] Disponible en:<https://core.ac.uk/download/pdf/54220179.pdf>
 - 44 Ciapara I, Valenzuela L and Goycoolea FM. astaxanthin: A Review of its Chemistry and Applications. Crit Rev Food Sci Nutr. [Internet] 2006 [citado 2018 abril 24];46(2):185-96. Available in:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16431409>
 - 45 García A, Estudio de la producción de astaxantina por *Xanthophyllomyces dendrorhous*. Universidad de leon. Departamento Biología Molecular [Internet] 2012 [citado 2019 enero 9] Disponible en: https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/2144/tesis_1a2340.PDF?sequence=1
 - 46 Córdoba NM, Acero NL, Duque LF, Jiménez LJ, Serna JA. Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. AGCIENCIA [Internet]. 2015 [citado 2019 marz 29];21:73-82. Disponible en: <http://revistas.ugca.edu.co/index.php/ugciencia/article/view/426/729>.
 - 47 Meléndez A, Vicario I y Francisco J. Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. Archivos Latinoamericanos de Nutrición [Internet]. 2004 [citado 2019 ene 6];54(2) . Disponible en:https://www.researchgate.net/publication/262738748_Importancia_nutricional_de_los_pigmentos_carotenoides

- 
- 48 Meyers, S. P. Papel del carotenoide astaxantina en nutrición de especies acuáticas. [Internet]. 2004 [citado 2019 abril 3]; 473-491. Disponible en: https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/28meyers.pdf
 - 49 Ibañez M producción de astaxantina a partir de la microalga haematococcus pluvialis y evaluación de posibles aplicaciones, XXI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral [Internet] 2017 [2019 abril 3]; 26(2): 3-9 Disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8080/colecciones/xmlui/bitstream/handle/123456789/8673/10.2.2.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 - 50 Herrera M, Sánchez D, López J, Nuñez A y Moreno O, Extracción de la astaxantina y su estabilidad, Revista Latinoamericana de Recursos Naturales [Internet] 2011 [2019 abril 3]; 7 (1): 21-27 Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Jose_Alberto_Nunez-Gastelum/publication/271707353_Extraccion_de_la_astaxantina_y_su_estabilidad/links/54d063c10cf298d656667a43/Extraccion-de-la-astaxantina-y-su-estabilidad.pdf
 - 51 Hernández A and Labbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de biología marina y oceanografía [Internet] 2014 [citado 2018 agos 4]; 49 (2): 157-173 Available in: https://www.researchgate.net/publication/267629066_Microalgas_cultivo_y_beneficios
 - 52 Odjadjare EC, Mutanda T and Olaniran AO. Potential biotechnological application of microalgae: a critical review. Critical Reviews in Biotechnology [Internet] 2017 [citado 2018 mar 30]; 3737-52 Available in <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2015.1108956?journalCode=ibty20>
 - 53 Miranda A, Efecto de las Bajas Concentraciones de Nitratos y Fosfatos sobre la Acumulación de Astaxantina en *Haematococcus pluvialis* UTEX 2505 Inf. tecnol. [Internet] 2019 [2019 abril 3]; 30 (1): 23-32 Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642019000100023
 - 54 Boussiba S. Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. Physiologia Plantarum [Internet] 2000.[citado 2019 marz 29]; 108: 111–117 Available in: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>
 - 55 Shah M, Liang Y, Cheng JJ, et al. Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus pluvialis*: From Single Cell to High Value Commercial Products. Frontiers in plant science [Internet] 2016 [citado 2019 ene 12] Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27200009>
 - 56 Ramírez D. Evaluación del crecimiento y producción de astaxantina por *Haematococcus pluvialis* en un fotobiorreactor tipo airlift [Tesis presentada para optar el título de Magíster en Ingeniería Química] Bogotá: Universidad Nacional de Colombia ;2013[citado 2017 nov 3]. Available in: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11205/1/300061.2013.pdf>
 - 57 Zhang C, Liu J and Zhang L. Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. Chin J of Ocean Limnol. [Internet] 2017 [citado 2018 abril 24] 35 (5) 1205–12111. Available in: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00343-017-6103-8>
 - 58 Fernandez D, Barrera N, Fonseca L y Jaimes L, Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas, Fundación Universidad de América Semilleros Formación Investigativa [Internet] 2017 [citado 2019 ene 10]; 3 (1): 35-48. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/6436>
 - 59 Benavente J, Montañez C, et al. Tecnología de Cultivo de Microalgas en Fotobiorreactores. Revista científica de la universidad autónoma de coahuila. [Internet] 2014 [citado 2019 marz 29]; 7(4). Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/262560081_Tecnologia_de_Cultivo_de_Microalgas_en_Fotobiorreactores

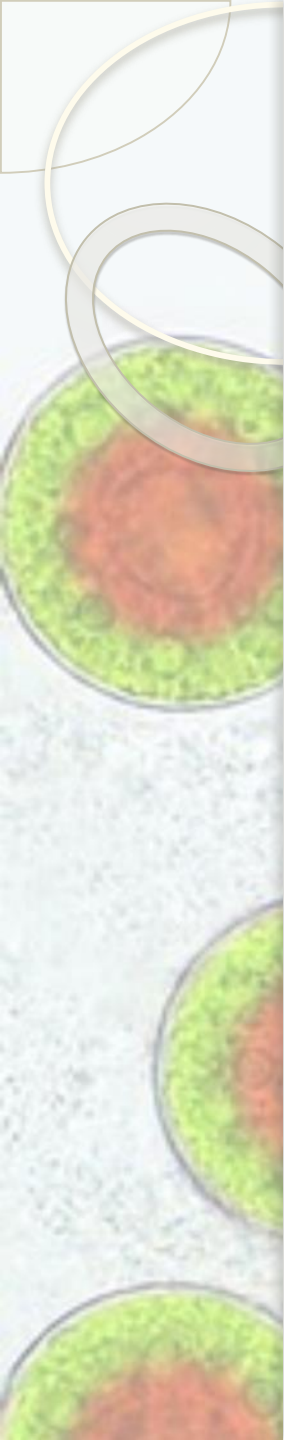
- 
- ⁶⁰ Bohne F and Linden H. Regulation of carotenoid biosynthesis genes in response to light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et biophysica acta* [Internet] 2002 [citado 2019 ene 14]; 13;1579(1):26-34. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401216>
 - ⁶¹ Khanam I and Deb U. Calculation of the Average Irradiance and the Microalgae Growth for a Year at CUET, Bangladesh. *American Journal of Computational Mathematics* [Internet] 2016 [citado 2018 septiembre 14]; 6(3). Available in: <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=70402>
 - ⁶² Bravo F, LeMay V, Jandl R, et al. *Managing Forest Ecosystems: The Challenge of Climate Change*. Springer Netherlands [Internet] 2008.[citado 2018 septiembre 14].Available: <https://www.springer.com/la/book/9781402083426>
 - ⁶³ Albarracin I. Microalgas: potenciales productoras de biodisel. centro de energias [Internet] 2007 [citado 2018 septiembre 14]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/461/46125177011.pdf>
 - ⁶⁴ Granada G, Produccion de astaxantina a partir de microalgas *Haematococcus pluvialis*, [Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar titulo de ingenereia en biotecnología]. udla [Internet] 2015 [citado 2019 ene 25] Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/4183/1/UDLA-EC-TIB-2015-04%28S%29.pdf>
 - ⁶⁵ Mostafa N,Hishamuddin O, Soon G and Suhaimi N.studies on the Genetic Variation of the Green Unicellular Alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) Obtained from Different Geographical Locations Using ISSR and RAPD Molecular Marker, *Molecules* [Internet] 2011 [2019 abril 3]; 16, 2598-2608 Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/16/3/2599/htm>
 - ⁶⁶ Cuantificación clorofila a [Internet] 2015 [2019 abril 3]Disponible en: http://www.cofes.org.ar/descargas/relas/5_jornada/4_CLOROFILA.pdf
 - ⁶⁷ Masojidek J, Torzillo G and koblizek M, Photosynthesis in Microalgae, Richmond A and Hu Q, *Manual de Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, [Internet] 2015 [citado 2018 septiembre 20]2: 21-736 Available in: https://books.google.com.co/books?id=SM6m4GZ_Ok0C&printsec=frontcover&dq=%20microalgas+de+Amos+Richmond&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjVo9PJxMjdAhWM%20uFMKHVRKAIQ6AEIKDAA#v=snippet&q=microalgas%20de%20Amos%20Rich%20mond&f=false
 - ⁶⁸ Lodish H, Berk A, Matsudaira P at eal, *Biología celular y molecular 7ma Edicion*, Argentina: Editorial Médica Panamericana, [Internet] 2016 [citado 2018 septiembre 20]Available in: <https://books.google.com.co/books?id=YdyMSxY2LjMC&pg=PA334&dq=clorofila&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiCjo2bwMrdAhUQ2FMKHUprBSsQ6AEIMjAC#v=onepage&q=clorofila&f=false>
 - ⁶⁹ Rosas C,“PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS EN LA COLUMNA DE AGUA DETERMINADOS MEDIANTE TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS Y CROMATOGRÁFICAS (HPLC-RP): VARIABILIDAD ESPACIO-TEMPORAL Y EFECTOS DE RADIACIÓN UV”. [Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al grado de Licenciado en Ciencias Biológicas.]. Chile Universidad Austral de Chile [Internet] 2007 [citado 2019 ene 25] Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcr789p/doc/fcr789p.pdf>
 - ⁷⁰ Camacho J, Lancheros A, Huerfano M, Condiciones de cultivo estándar relacionados con la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, @limentech ciencia y tecnología alimentaria [Internet] 2016 [2019 abril 4]; 14 (1) 70 -80 Disponible en: http://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/2127/1265

- 
- ⁷¹ Hernández E , Aguirre N Y Palacio J. Relación entre la determinación del pigmento Clorofila a y el Biovolumen geométrico algal en un lago de planicie de inundación (Ciénaga de Ayapel, Córdoba-Colombia) Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia [Internet] 2011 [2019 abril 4]; 60 159-169 Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfiua/n60/n60a16.pdf>
 - ⁷² Butnariu M, Methods of Analysis (Extraction, Separation, Identification and Quantification) of Carotenoids from Natural Products, Butnariu, J Ecosys Ecograph [Internet] 2016 [2019 abril 4]; 6 (2): 2-19 Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/methods-of-analysis-extraction-separation-identification-and-quantification-of-carotenoids-from-natural-products-2157-7625-1000193.php?aid=77160>
 - ⁷³ Vargas M y Ríos S. Producción de ácidos grasos y Astaxantina en *H. pluvialis* bajo condiciones de, estrés [Proyecto de grado Bacteriología y laboratorio clínico] Bogotá: Universidad Colegio Mayor and de Cundinamarca; 2015[citado 2017 oct 3]. referencia Producción de ácidos grasos y Astaxantina en *H. pluvialis* bajo condiciones de estrés.
 - ⁷⁴ Bastidas O,Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro, Celeromics [Internet] [citado 2018 abril 30] Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
 - ⁷⁵ M Halmi, M Shukor, W Johari, MY Shukor. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. Asian Journal of Plant Biology [Internet] 2014 [citado 2018 abril 7]; 2 (1) 01-06 Available in: <https://journal.hibiscuspublisher.com/index.php/AJPB/article/view/81/161>
 - ⁷⁶ Díaz J, Gómez L, Orozco M, Quiroga N. Efecto de estrés producido por la deficiencia de nitrógenos sobre el crecimiento y producción de astaxantina y la expresión de genes relacionados con la misma en el cultivo de *H. pluvialis*. [Proyecto de grado Bacteriología y Laboratorio Clínico]. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2016[citado 2017 oct 3].
 - ⁷⁷ Lallana, V.H. y Lallana Ma. del C Manual de Prácticas de Fisiología Vegetal.[Internet], 2003 [citado 2018 agos 20] Disponible en: http://www.fca.uner.edu.ar/files/academica/deptos/catedras/fisiologiaveg/m_didactico/manual_practicas/ExtPig_bED.pdf
 - ⁷⁸ Niño C.; Rodríguez. F. Evaluación de las condiciones de crecimiento celular y factores de estrés para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*.(Trabajo de grado para obtener el título de Bacteriología y laboratorio clínico) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá, Colombia. 2015 [citado 2019 marzo 10] Disponible en: Biblioteca Universidad Colegio Mayor de cundinamarca.
 - ⁷⁹ Martínez A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.[Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente]Universidad Politécnica de Valencia [Internet] 2011 [citado 2019 marz 22] Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
 - ⁸⁰ Beltran J, Guajardo C, Barceló I y López U .Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. Revista de Biología Marina y Oceanografía [Internet] 2017 [citado 2019 enero 23] 52 (3): 417-27 Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/revbiolmar/v52n3/art01.pdf>
 - ⁸¹ Bustillo A, método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos universidad nacional de palmira [Internet] 2010 [2019 abril 3]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/277870402_METODO_PARA_CUANTIFICAR_SUSPENSIONES_DE_ESPORAS_DE_HONGOS_Y_OTROS_ORGANISMOS

- ⁸² Dickerson R, Gray H, Darensbourg M y Darensbourg D. Principios de química, 3^{era} edición, España, Editorial reverté, equilibrio en disolución: ácidos y bases [Internet] 1992 [citado 2019 marz 3] Cap 5 163-208 Disponible en: <https://books.google.com.co/books?id=vVt6frGy9mgC&pg=PA190&dq=disociacion+del+acetato+de+sodio+en+agua&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjzcxuOfgAhVI1IkKHxOtDqkQ6AEIKTAA#v=onepage&q=disociacion%20del%20acetato%20de%20sodio%20en%20agua&f=false>
- ⁸³ Viada E, Gómez L, y Reyna I Estrés oxidativo ccm [Internet] 2017.[citado 2019 marz 3]21 (1) ;Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014
- ⁸⁴ Ruijuan M, Skye T, Elvis C, Eladl E and et al ,Blue light enhances astaxanthin biosynthesis metabolism and extraction efficiency in *Haematococcus pluvialis* by inducing haematocyst germination. Algal Research [Internet] 2018 [citado 2019 feb 26]35; 215-222 Available in: : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192641830328X>
- ⁸⁵ Rio M. Producción de astaxantina por la microalga *Haematococcus pluvialis* en cultivo continuo, Universidad de sevilla [Internet] 2007 [citado 2019 marz 5] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=138280>
- ⁸⁶ La astaxantina natural vs su homólogo sintético XVII Congreso nacional de acuicultura cartagena [Internet] 2019 [citado 2019 enero 23] Disponible en: <http://www.mispecies.com/nav/actualidad/reportajes/reportaje/La-astaxantina-natural-vs-su-homologo-sinttico/#.XKGDytJKjtS>
- ⁸⁷ Dong K, Durairaj V, Ramasamy P, Jong I at eal. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: Chlorella and Haematococcus Bioresource Technology [Internet] 2016 [citado 2019 marz 5]199; 300-310 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415012134?via%3Dihub>
- ⁸⁸ EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on the safety and efficacy of synthetic astaxanthin as feed additive for salmon and trout, other fish, ornamental fish, crustaceans and ornamental birds. EFSA Journal [Internet] 2014 [citado 2019 ene 23] 12(6):3724 Available in: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3724.pdf>
- ⁸⁹ Fábregas J, Domínguez A, Regueiro M and Maseda A, Otero A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*, Appl Microbiol Biotechnol. [Internet] 2000 [citado 2019 marz 25] ;53(5):530-5. Available in: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10855711>
- ⁹⁰ Jeeji N, Beena B and and Shashirekha V. Biology of growth conditions, nutrition and biomass development in *Haematococcus pluvialis*, Haematococcaceae, Chlorophyceae Phycological Society, India [Internet] 2016 [citado 2019 marz 7] 46 (2): 20-28 Available in: <http://www.phykosindia.com/paper4vol46no2.pdf>
- ⁹¹ Hata1 N, Ogonna1 J, Hasegawa1 Y, Taroda H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture Journal of Applied Phycology [Internet] 2001 [citado 2019 marz 7] 13: 395–402 Available in: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1011921329568>
- ⁹² Hanan N, Kaid N, Shukor H, Rahman N at eal. Pre-Optimization Conditions for *Haematococcus pluvialis* Growth. International Journal [Internet] 2013 [citado 2019 marz 7] 3 (2) 70-73 Available in: <http://insightsociety.org/ojaseit/index.php/ijaseit/article/viewFile/307/277>



- ³ Rammunia M, Ariyadasa T, Nimarshana P, and Attalage R. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and β -carotene from *D. salina* Food Chemistry [Internet] 2019 [citado 2019 marz 7] 277; 128-134 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618318417?via%3Dihub>
- ⁹⁴ Moronta, R., Mora, R., y Morales, E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista de la Facultad de Economía, [Internet] 2006 [citado 2019 marz 25] 23(1), 28-43 Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0378-78182006000100003&script=sci_abstract
- ⁹⁵ Sun H, Kong Q, Geng Z, Duan L et al Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* Bioresource Technology [Internet] 2015 [citado 2019 marz 9] 186; 67-73 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852415002874?via%3Dihub>
- ⁹⁶ Ruijuan Ma, Skye R., Elvis T, Faisal A et al Gene expression profiling of astaxanthin and fatty acid pathways in *Haematococcus pluvialis* in response to different LED lighting conditions Bioresour Technol. [Internet] 2018 [citado 2019 marz 9] 250; 591-602 Available in: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417320989?via%3Dihub>

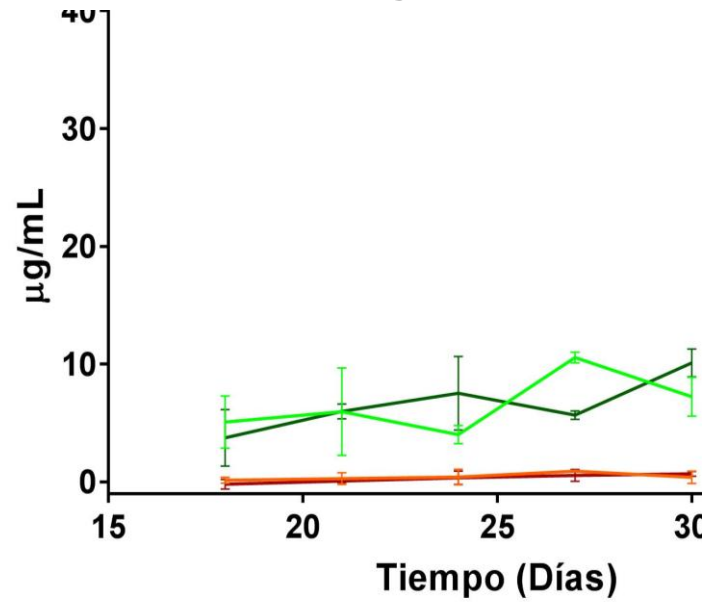


Gracias

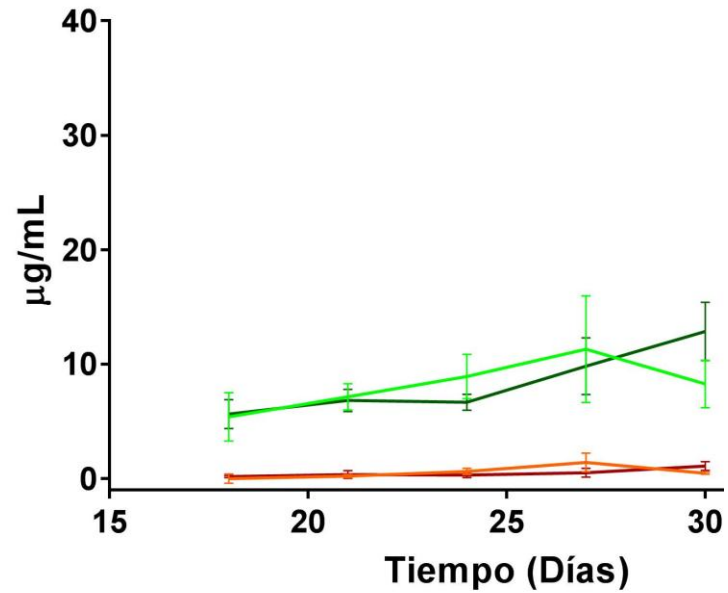
Anexos

BBM

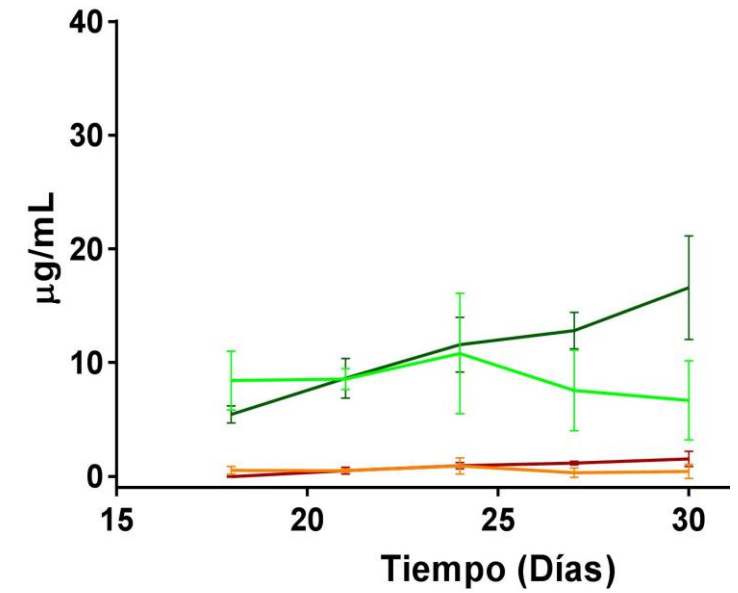
0.248 mg/mL de AS



0.310 mg/mL de AS

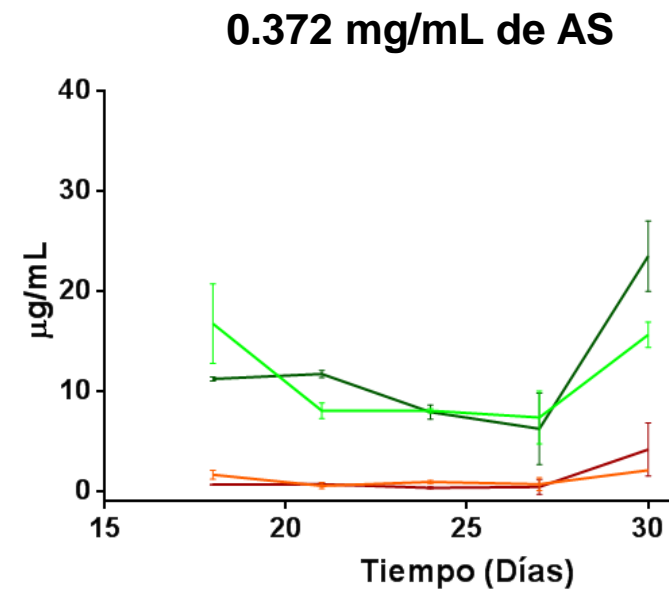
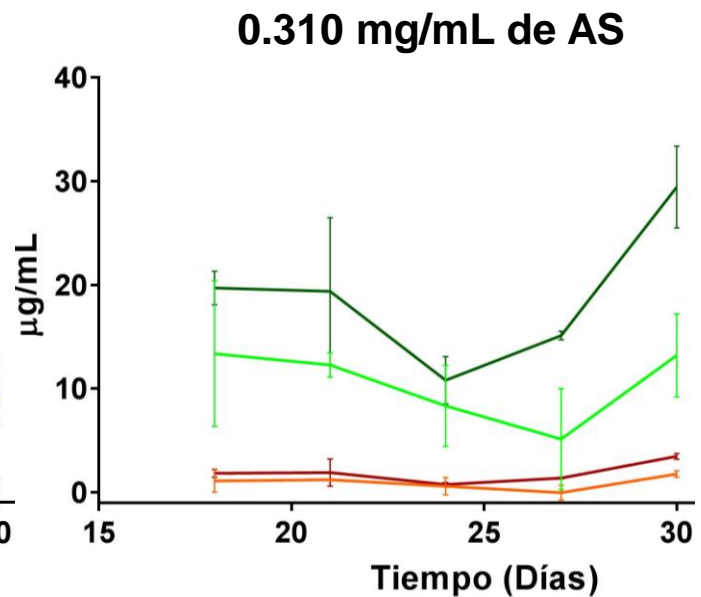
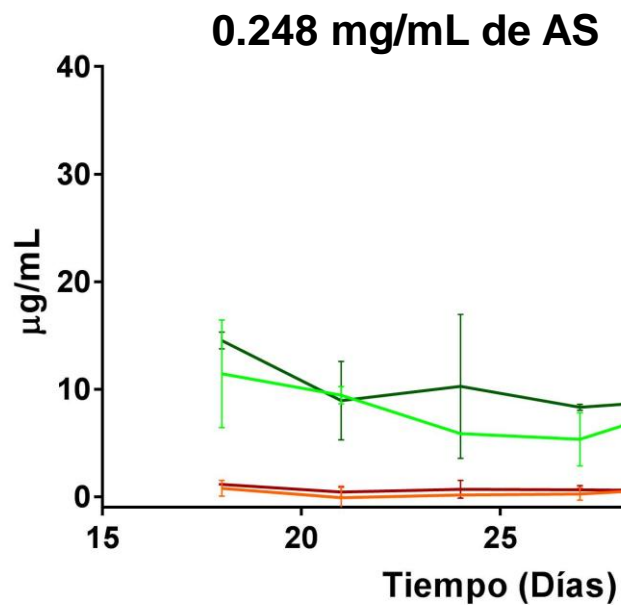


0.372 mg/mL de AS



- Clorofila-Luz Blanca
- Clorofila-Luz Azul
- Astaxantina-Luz Blanca
- Astaxantina-Luz Azul

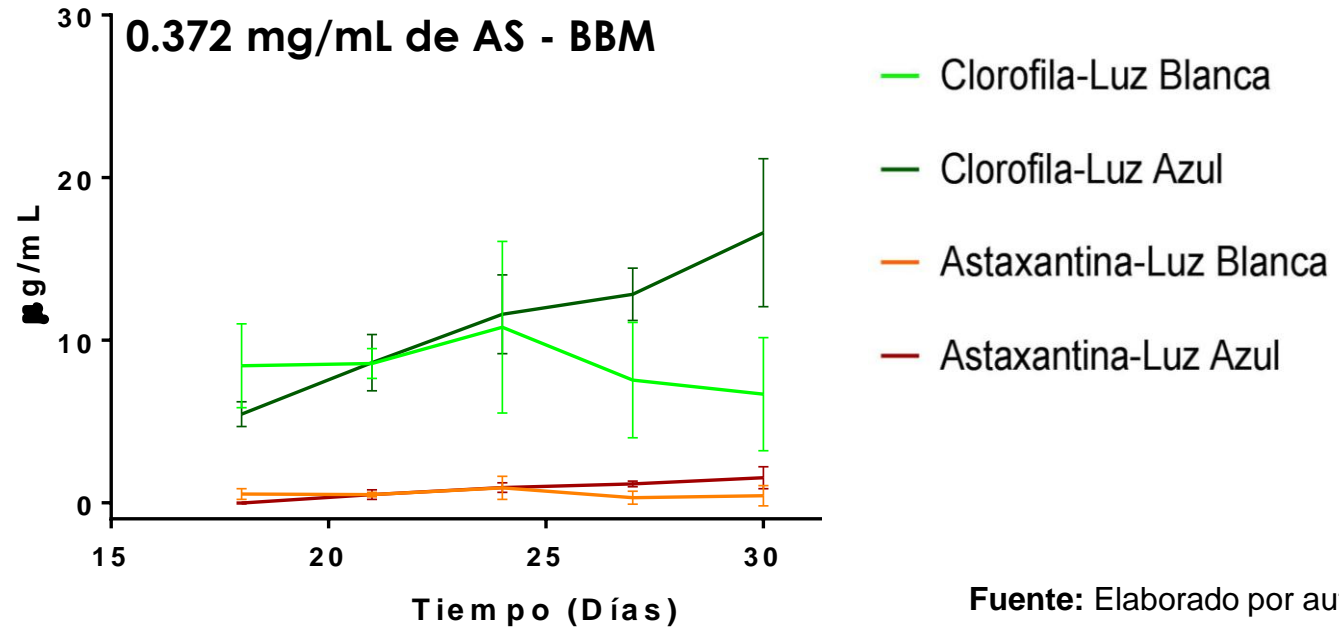
RM



- Clorofila-Luz Blanca
- Clorofila-Luz Azul
- Astaxantina-Luz Blanca
- Astaxantina-Luz Azul

Fase II: Determinación de la producción de astaxantina y clorofila: cambio morfológico

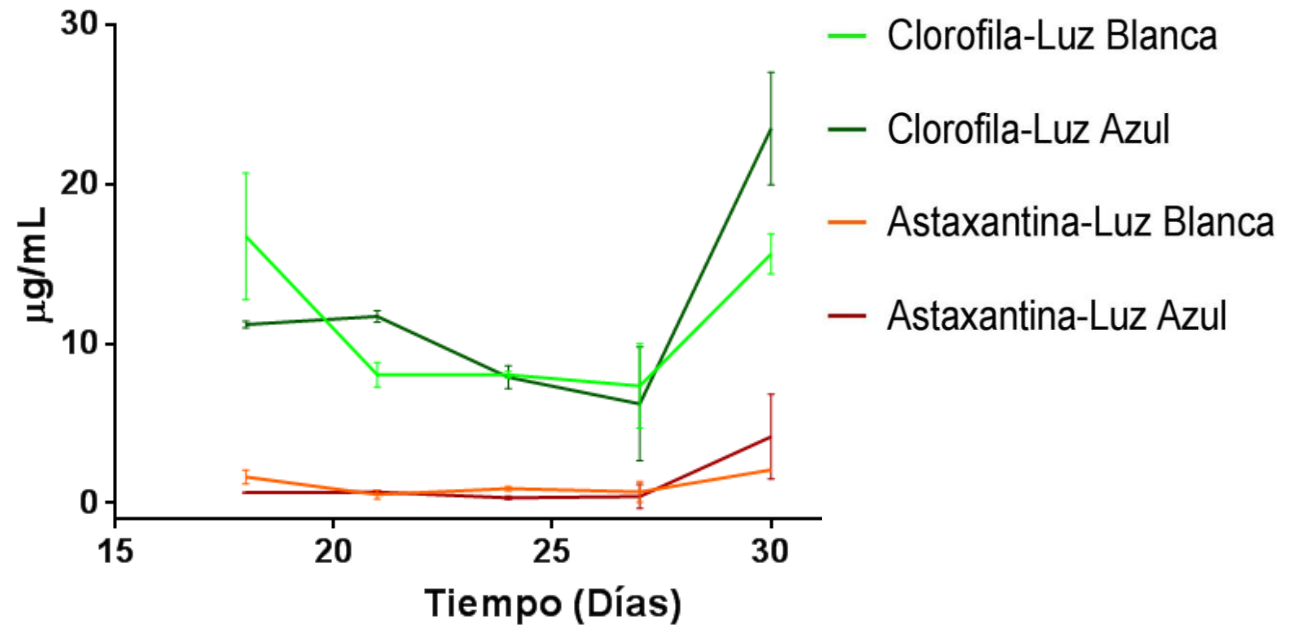
Relación de astaxantina y clorofila medio BBM



	Concentración inicial (µg/mL)	Concentración final (µg/mL)	Variación
Clorofila luz blanca	8,43 – 10.80	6.67	38.2% ↓
Clorofila luz azul	5.44	16.60	67.9% ↑
Astaxantina luz blanca	0.52 – 0.92	0.78	15.03% ↓
Astaxantina luz azul	0.01	1.93	99.45% ↑

Fase II Determinación de la producción de astaxantina y clorofila

Relación de astaxantina y clorofila medio RM 0.372 mg/mL de AS - RM



Fuente: Elaborado por autoras.

Vidhyavathi et. al. 2008.

	Concentración inicial (µg/mL)	Concentración final (µg/mL)	Variación
Clorofila luz blanca	16.74 – 7.35	15.62	56.1% ↓ 49.4% ↑
Clorofila luz azul	11.19 - 6.23	23.66	20% ↓ 73.68% ↑
Astaxantina luz blanca	1.62	2.07	21.62% ↑
Astaxantina luz azul	0.64	5.06	87.31% ↑

Introducción

Objetivos

Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones y recomendaciones