



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Curso académico 2020/2021

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

DOBLE GRADO EN QUÍMICA Y EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN QUÍMICA

**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANALÍTICA DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS EN CULTIVOS
BIOTECNOLÓGICOS**

Diego González Iglesias

Julio, 2021



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Curso académico 2020/2021

La Dra. Marta Lores Aguín y la Dra. Carmen María García Jares, Profesoras Catedráticas del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela, informan que el trabajo titulado:

“Extracción y Caracterización Analítica de Compuestos Bioactivos en Cultivos Biotecnológicos”

fue realizado, bajo su dirección, como Trabajo de Fin de Grado por Diego González Iglesias.

Asdo.: Marta Lores Aguín

Asdo.: Carmen María García Jares

LISTADO DE ABREVIATURAS

Å	Armstrong (1×10^{-10} m)
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (detector de red de diodos)
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (y otros)
g	Gramo
GC	<i>Gas Chromatography</i> (cromatografía de gases)
h	Hora
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (cromatografía de líquidos de alta resolución)
kg	Kilogramo (1×10^3 g)
L	Litro
lx	Lux
M	Molar (mol/L)
mg	Miligramo (1×10^{-3} g)
min	Minuto
ml	Mililitro (1×10^{-3} L)
mm	Milímetro (1×10^{-3} m)
mM	Milimolar (1×10^{-3} M)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSPD	<i>Matrix solid phase dispersion</i> (dispersión de matriz en fase sólida)
µg	Microgramo (1×10^{-6} g)
µL	Microlitro (1×10^{-6} L)
µm	Micrómetro (1×10^{-6} m)
µV	Microvoltios (1×10^{-6} V)
nm	Nanómetro (1×10^{-9} m)
ppb	Partes por billón (µg/L)
ppm	Partes por millón (mg/L)
\$	Dólar americano

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	7
1. Resumen.....	7
2. Resumen	7
3. Abstract.....	8
INTRODUCCIÓN	9
1. <i>Haematococcus pluvialis</i>	9
2. Astaxantina.....	11
3. Ácidos grasos	14
4. Extracción	14
5. Caracterización de los compuestos.....	15
5.1. HPLC-DAD	15
5.2. GC-MS	16
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	17
PARTE EXPERIMENTAL	18
1. Materiales e instrumentación	18
2. Reactivos.....	19
3. Preparación de rectas de calibrado y disoluciones patrón	21
4. Muestras.....	22
5. Extracción	23
6. Análisis espectrofotométrico.....	25
6.1. Medición de nitratos.....	25
6.2. Medición de carotenoides.....	26
7. Análisis cromatográfico	26
7.1. HPLC-DAD	26
7.2. GC-MS	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1. Diseño experimental biológico.....	29
2. Compuestos bioactivos	32
2.1. Análisis de carotenoides	33
2.2. Análisis de ácidos grasos.....	39
CONCLUSIONES	44
1. Conclusiones	44
2. Conclusións	44
3. Conclusions	45
BIBLIOGRAFÍA	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular de <i>Haematococcus pluvialis</i> . Tomado y modificado de Domínguez et al., 2006.	10
Figura 2. Curvas de calibrado para los carotenoides estudiados.	21
Figura 3. Curvas de calibrado para los ácidos grasos estudiados.	22
Figura 4. Fotobiorreactor de 1 L con fase vegetativa.	23
Figura 5. Esquema de la extracción vía mini-MSPD.	24
Figura 6. Espectrofotómetro UV-Vis empleado en la medición de nitrato y carotenoides totales.	25
Figura 7. Evolución de la fase de producción de biomasa de <i>Haematococcus pluvialis</i> a medida que se consumen los nitratos del medio.	25
Figura 8. Cromatógrafo de líquidos acoplado a detector de red de diodos (HPLC-DAD) empleado en el análisis de carotenoides.	26
Figura 9. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) empleado en el análisis de los ácidos grasos.	27
Figura 10. Fotobiorreactores de 80 mL el último día del experimento.	30
Figura 11. Células de <i>Haematococcus pluvialis</i> el último día del experimento bajo microscopio óptico con un aumento x1000 (x100 del objetivo y x10 del ocular). En la fila superior, de izquierda a derecha: B10, B1A y B1C. En la fila inferior, de izquierda a derecha.	30
Figura 12. Evolución de los carotenoides durante los tres últimos días de la fase de inducción ($\mu\text{g/mL}$).	31
Figura 13. Fases de inducción llevadas a análisis cromatográfico. De izquierda a derecha: B1A, B1C y A1C.	32
Figura 14. Concentración porcentual relativa a los principales carotenoides presentes en <i>Haematococcus pluvialis</i> a lo largo de las diferentes fases del proceso.	33
Figura 15. Células de A1C bajo microscopio óptico con aumento x1000 (x100 de objetivo y x10 de ocular).	36
Figura 16. Cromatograma de carotenoides obtenido para un extracto de A1C.	36
Figura 17. Cromatograma de carotenoides obtenido para aplanósporas rojas en el que se muestran los ésteres de astaxantina. Tomado y modificado de Holtin et al., 2009.	37
Figura 18. Superposición de los espectros de absorción de un extracto A1C (rosa) y el patrón (azul). A, isómero de luteína. B, C y D, ésteres de astaxantina.	38
Figura 19. Cromatograma de ácidos grasos obtenido para un extracto de A1C.	39
Figura 20. A, espectro de masas experimental para el ácido linoleico obtenido de un extracto A1C. B, espectro de masas teórico para el ácido linoleico.	40
Figura 21. Visión comparada de la concentración de ácidos grasos, siendo AG ácidos grasos y PS peso seco.	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Contenido en peso seco de <i>Haematococcus pluvialis</i> en su estado verde y en su estado rojo.	12
Tabla 2. Patrones de carotenoides empleados.	19
Tabla 3. Patrones de ácidos grasos empleados.	19
Tabla 4. Disolventes empleados.	20
Tabla 5. Reactivos empleados.	20
Tabla 6. Parámetros utilizados para la extracción.	23
Tabla 7. Etiquetas de la fase de inducción.	29
Tabla 8. Concentración de los principales carotenoides presentes en las diferentes fases celulares de <i>Haematococcus pluvialis</i> (mg/g).	35
Tabla 9. Identificación de los principales carotenoides presentes en un extracto AIC..	37
Tabla 10. Identificación de los principales ácidos grasos para un extractor AIC. Valores en negrita indican el ión de cuantificación. Valores entre paréntesis indican la abundancia de cada ión.	41
Tabla 11. Relación astaxantina/ácidos grasos para BIC y AIC (mg/mg).....	42

RESUMEN

1. Resumen

Este trabajo ofrece una visión comparada del contenido en compuestos bioactivos, presentes en la microalga *Haematococcus pluvialis* a lo largo de diferentes fases de su ciclo celular, desde su estado vegetativo móvil, hasta aplanósporas cultivadas bajo diferentes condiciones ambientales de iluminancia y disponibilidad de CO₂. Debido a la dura pared celular de las aplanósporas, se llevó a cabo una técnica de extracción rápida, sencilla, económicamente viable y respetuosa con el medio ambiente, que permite una fácil disrupción de las muestras, la dispersión de matriz en fase sólida, MSPD, obteniéndose unos extractos ricos en carotenoides y ácidos grasos. Mediante la caracterización cromatográfica de estos compuestos se observa una mayor acumulación a medida que avanza el periodo de enquistamiento, la intensidad luminosa y la disponibilidad de CO₂, siendo la concentración de carotenoides y ácidos grasos máxima para aplanósporas sometidas a alta iluminancia y aporte de CO₂ externo (8,8 y 14,3 mg/g, respectivamente) y mínima para la fase vegetativa (3,3 y 1,7 mg/g, respectivamente).

2. Resumo

Este traballo ofrece unha visión comparada do contido en compostos bioactivos, presentes na microalga *Haematococcus pluvialis* ao longo de diferentes fases do seu ciclo celular, desde o seu estado vexetativo móbil, ata aplanósporas cultivadas baixo diferentes condicións ambientais de iluminancia e dispoñibilidade de CO₂. Debido á dura parede celular das aplanósporas, levouse a cabo unha técnica de extracción rápida, sinxela, economicamente viable e respectuosa co medio ambiente, que permite unha fácil disrupción das mostras, a dispersión de matriz en fase sólida, MSPD, obténdose uns extractos ricos en carotenoides e ácidos graxos. Mediante a caracterización cromatográfica destes compostos obsérvase unha maior acumulación a medida que avanza o período de enquistamiento, a intensidade luminosa e a dispoñibilidade de CO₂, sendo a concentración de carotenoides e ácidos graxos máxima para aplanósporas sometidas a alta iluminancia e achega de CO₂ externo (8,8 e 14,3 mg/ g, respectivamente) e mínima para a fase vexetativa (3,3 e 1,7 mg/ g, respectivamente).

3. Abstract

This work provides a comparative view of the content of bioactive compounds present in the microalga *Haematococcus pluvialis* throughout different phases of its cell cycle, from its motile vegetative state to aplanospores grown under different environmental conditions of illuminance and CO₂ availability. Due to the hard cell wall of aplanospores, a fast, simple, economically viable and environmentally friendly extraction technique, which allows easy disruption of the samples, solid phase matrix dispersion, MSPD, was used to obtain extracts rich in carotenoids and fatty acids. Chromatographic characterisation of these compounds shows a greater accumulation as the encystation period, light intensity and CO₂ availability progress, with the concentration of carotenoids and fatty acids being maximum for aplanospores subjected to high illuminance and external CO₂ supply (8.8 and 14.3 mg/g, respectively) and minimum for the vegetative phase (3.3 and 1.7 mg/g, respectively).

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo de diversos microorganismos que realizan la fotosíntesis oxigénica. Dentro de esta clasificación se encuentran algas microscópicas y bacterias que realizan este proceso, como las cianobacterias.

Una de las características más resaltables de estos microorganismos es su capacidad de adaptación al medio donde viven. De esta manera, pueden crecer en condiciones de alta y baja luminosidad, alcalinidad, salinidad, toxicidad y temperatura (Kobayashi *et al.*, 1993; Tjahjono *et al.*, 1994; Cordero *et al.*, 1996; Sarada *et al.*, 2002). Su pequeño tamaño y rápida reproducción, en comparación con las algas pluricelulares, permiten su cultivo en espacios reducidos mediante reactores tubulares o esféricos, y placas, creando granjas de microalgas de moderado tamaño con elevada productividad (Ledda *et al.*, 2016).

La mayoría de estos microorganismos son fotoautótrofos, por lo que pueden emplear la luz solar para obtener energía y fijar CO₂ para la biosíntesis de moléculas complejas. Así, esta bioquímica tan diversa, los convierten en una materia prima muy atractiva para cualquier proceso, siendo utilizadas en la actualidad, principalmente, en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Mularczyk *et al.*, 2020). También existen microalgas heterótrofas que son capaces de asimilar moléculas orgánicas, con aplicaciones muy interesantes como el tratamiento de aguas residuales (Casagli *et al.*, 2021).

Una de las especies de algas microscópicas más reconocidas a nivel mundial es *Haematococcus pluvialis*, por ser una de las mejores fuentes naturales de un carotenoide de la familia de las xantofilas denominado astaxantina (Ambati *et al.*, 2014).

1. *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis es un alga verde, unicelular que pertenece a la división *Chlorophyta*. Es una microalga de agua dulce que presenta dos flagelos impulsores del mismo tamaño, isocontos, insertados en la parte posterior de la célula, opistocontos. Presenta un ciclo celular complejo con distintas formas celulares, cambiando de una a otra en función de los factores del cultivo (Elliot, 1934). Se han distinguido tres formas, una verde, ovalada y flagelada denominada célula vegetativa;

una verde, esférica y sin flagelos denominada palmella; y una roja, esférica y sin flagelos denominada aplanóspora (Santos & Mesquita, 1984).

En condiciones favorables de cultivo *Haematococcus pluvialis* presenta una forma vegetativa compuesta por células móviles, caracterizadas por una débil estructura externa constituida por una membrana celular. En contraste, si el entorno en el que vive este microorganismo presenta una cantidad insuficiente de nutrientes, así como otros factores de estrés: irradiación excesiva, salinidad o modificaciones de la temperatura; se induce una fase intermedia o palmella, la cual, si se perpetúan dichos parámetros, terminará convirtiéndose en una fase estacionaria compuesta por aplanósporas rojas. A su vez, la característica cíclica del proceso permite regresar a las condiciones generales, donde, mediante la restauración de las condiciones óptimas de crecimiento, germinan produciendo células vegetativas móviles (figura 1).

Las aplanósporas son quistes de resistencia que permiten que la microalga sobreviva a condiciones ambientales adversas durante prolongados periodos de tiempo. Se caracterizan por presentar una pared celular engrosada muy resistente, y por ser la fase en la que tiene lugar la síntesis y acumulación de astaxantina en glóbulos citoplasmáticos, confiriéndoles su color rojo (Chekanov *et al.*, 2014).

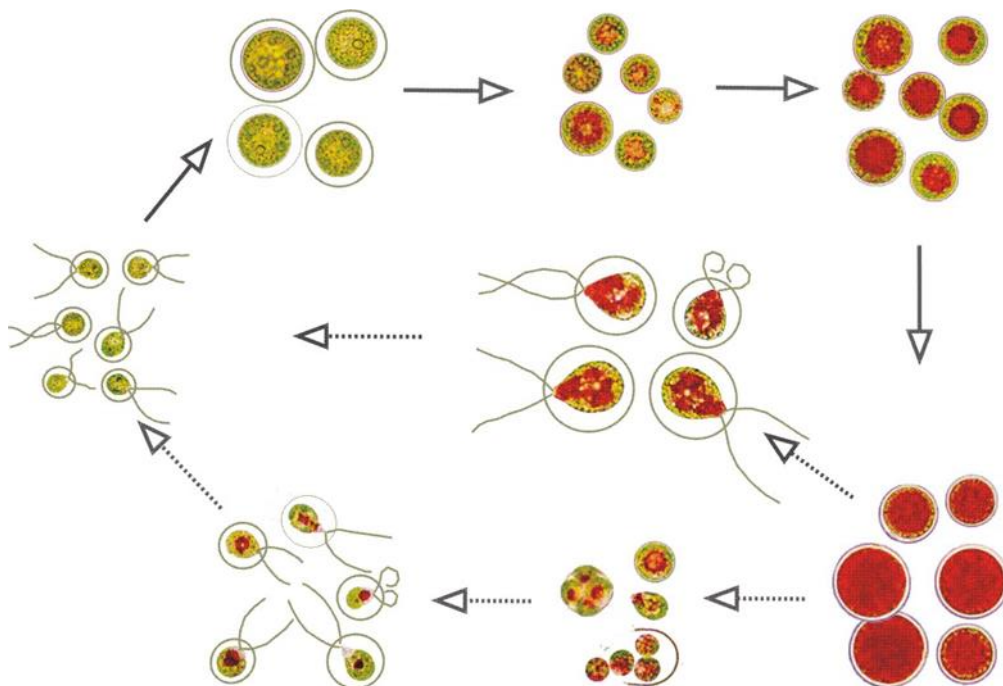


Figura 1. Ciclo celular de *Haematococcus pluvialis*. Tomado y modificado de Domínguez *et al.*, 2006.

2. Astaxantina

La astaxantina es un carotenoide rojo (3,3-dihidroxi- β - β -caroteno-4,4-diona) derivado del β -caroteno con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, farmacéutica y nutracéutica (Shah *et al.*, 2016). Presenta 13 dobles enlaces conjugados confiriéndole a la molécula una fuerte actividad antioxidante para neutralizar radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Miki, 1991; Vershinin, 1999). Se han demostrado efectos beneficiosos para la salud por sus propiedades contra enfermedades coronarias y anticancerígenas (Guerin *et al.*, 2003).

El principal mercado de la astaxantina también se encuentra en la acuicultura como colorante natural para peces rosados, principalmente salmónidos, que no son capaces de sintetizar astaxantina *de novo* y necesitan su aporte en la dieta (Dissing *et al.*, 2011). El precio de mercado de la astaxantina es aproximadamente 2500 US\$/kg, estimándose el mercado anual en 200 millones de US\$, siendo el 95% de la astaxantina destinada a la acuicultura de origen sintético por ser económicamente más viable (Lorenz & Cysewski, 2000). Sin embargo, debido al uso como materia prima de derivados petroquímicos y a la preocupación por la pérdida de su bioactividad y seguridad alimenticia, se está demandando su sustitución por una alternativa de origen natural, estimándose que el coste de producción de astaxantina puede alcanzar valores mínimos de 718 US\$/kg, frente a un estimado 1000 US\$/kg de la vía sintética, crea una oportunidad real para la producción de astaxantina a partir de *Haematococcus pluvialis* (Li *et al.*, 2011).

La astaxantina en *Haematococcus pluvialis* es acumulada durante el periodo de enquistamiento, en el cual la fase móvil, vegetativa y verde se termina convirtiendo en aplanóspora roja. Esta microalga bajo diferentes condiciones de estrés es capaz de llegar a acumular grandes cantidades de astaxantina, hasta el 5% en peso seco. En torno al 95% de la astaxantina acumulada se encuentra formando ésteres con ácidos grasos, quedando solo el 5% en forma libre (Yuan & Chen, 2000; Lemoine & Schoefs, 2010)

Los factores que inducen la síntesis y acumulación de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* han sido ampliamente estudiados, sin embargo, la función que desempeña este carotenoide es todavía objeto de discusión. Inicialmente, se creía que el papel de la astaxantina era exclusivamente fotoprotector, es decir, que su síntesis y

acumulación estaban controladas por intensidades de luz elevadas (Fan *et al.*, 1998), pudiendo acumularla en su fase móvil si se sometiera a dichas condiciones. Sin embargo, se ha demostrado que la síntesis de astaxantina solo tiene lugar cuando el cultivo entra en el periodo de enquistamiento para producir aplanósporas, y este periodo solo comienza cuando el cultivo haya agotado la fuente de nitrógeno, convirtiéndose en el factor determinante tanto para comenzar el periodo de enquistamiento, como para la síntesis de astaxantina (Fábregas *et al.*, 1998).

Como resultado de estas investigaciones, la producción de astaxantina de *Haematococcus pluvialis* a nivel industrial se realiza en un sistema de cultivo en dos fases. En la primera de ellas se cultiva la microalga en su fase móvil verde hasta generar la cantidad de biomasa deseada. A continuación, ocurre una segunda fase de inducción en la que el cultivo, habiendo agotado los nutrientes del medio, se somete a intensidades de luz elevadas para que tenga lugar la síntesis y acumulación de astaxantina (Fábregas *et al.*, 2001). Las condiciones de cultivo óptimas durante las fases de crecimiento y de inducción para maximizar la acumulación de astaxantina están bien estudiadas (Pereira & Otero, 2020).

La acumulación de la astaxantina tiene lugar durante un proceso de carotenogénesis que ocurre al mismo tiempo que el periodo de enquistamiento, pero todavía se desconoce si ambos procesos son totalmente dependientes. A continuación, en la tabla 1, se muestra una visión comparada de los compuestos principales presentes en *Haematococcus pluvialis* entre la fase móvil (estado verde) y las aplanósporas rojas (estado rojo) (Shah *et al.*, 2016).

Tabla 1. Contenido en peso seco de *Haematococcus pluvialis* en su estado verde y en su estado rojo. Tomado y modificado de Shah *et al.*, 2016. Siendo PS: peso seco, y n.d: no detectado.

Composición (% de PS)	Estado verde	Estado rojo
Proteínas	29-45	17-25
Lípidos (% del total)	20-25	32-37
Lípidos neutros	59	51,9-53,5
Fosfolípidos	23,7	20,6-21,1
Glicolípidos	11,5	25,7-26,5

Carbohidratos	15-17	36-40
Carotenoides (% del total)	0,5	2-5
Neoxantina	8,3	n.d
Violaxantina	12,5	n.d
β -caroteno	16,7	1,0
Luteína	56,3	0,5
Zeaxantina	6,3	n.d
Astaxantina (incluyendo ésteres)	n.d	81,2
Adonixantina	n.d	0,4
Adonirubina	n.d	0,6
Cantaxantina	n.d	5,1
Equinenona	n.d	0,2
Clorofilas	1,5-2	0

Debido a que la aplanóspora roja es una fase de resistencia en la que se ha activado el metabolismo secundario, y en consecuencia se han acumulado diferentes sustancias de reserva, se observa como la composición de lípidos, carbohidratos y carotenoides se incrementa respecto a su fase vegetativa móvil. Durante este proceso los principales carotenoides encontrados en la fase móvil, siendo el más abundante la luteína, se van perdiendo, mientras se va acumulando la astaxantina, siendo el principal carotenoide de dicho estado.

Como se ha mencionado anteriormente, el 95% de la astaxantina de *Haematococcus pluvialis* se encuentra esterificada con ácidos grasos, almacenándose en inclusiones lipídicas citoplasmáticas (Chen *et al.*, 2014). En contraste con el 5% de astaxantina que es capaz de acumular en la fase aplanóspora roja, la cantidad de lípidos que puede acumular es aproximadamente el 35% del peso seco, rico en ácidos grasos insaturados de las familias omega-3 y omega-6 (Cerón *et al.*, 2006; Butler *et al.*, 2017). De esta manera, es importante conocer el contenido bioactivo de la microalga, no solo

por solo por los carotenoides, sino también por su contenido de otros compuestos como los lipídicos.

3. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son biomoléculas de carácter anfipático por tener un extremo hidrofílico (grupo carboxilo) y un extremo hidrofóbico (cadena alifática). La longitud e insaturación de la cadena alifática es variable y determina las propiedades de dicho ácido graso.

Los ácidos grasos saturados son aquellas cadenas lipídicas las cuales no presentan dobles enlaces entre los carbonos de la cadena alifática, siendo la mayoría sólidos a temperatura ambiente y abundantes en grasas animales. Los insaturados presentan uno (monoinsaturados) o más (poliinsaturados) dobles enlaces en la cadena alifática, siendo la mayoría líquidos a temperatura ambiente y abundantes en grasas vegetales.

Las microalgas son capaces de sintetizar elevadas cantidades de ácidos grasos de alto valor, que pueden tener aplicación en la industria alimentaria, debido a la acumulación de ácidos grasos omega-3 y en la producción de biocombustible. Así, tanto el interés en desarrollar aplicaciones para la producción de alimentos ricos en omega-3, como en la producción de biocombustible a partir de microalgas se ha incrementado en los últimos años (Lei *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2017).

Aunque el contenido lipídico y proteico en *Haematococcus pluvialis* es superior al de carotenoides, los procesos extractivos se han enfocado en la extracción de un único compuesto, la astaxantina. Son diversas las metodologías extractivas que abordan la recuperación de este carotenoide, innovándose en busca de una mayor eficiencia en la extracción y disrupción, debido a la elevada rigidez de la pared celular de la microalga.

4. Extracción

La arquitectura celular de las aplanósporas de *Haematococcus pluvialis* está formada por una multicapa que consiste en una vaina trilaminar que separa la pared primaria y secundaria, siendo esta última la más gruesa e interna, todas envueltas por una matriz extracelular, lo que dificulta los procesos de extracción de la microalga (Hagen *et al.*, 2002).

Para la extracción efectiva de compuestos bioactivos presentes en *Haematococcus pluvialis*, es necesario realizar un tratamiento previo de la muestra debido a la pared

celular de las aplanósporas, por lo que se necesitan procesos energéticos para su ruptura. Las técnicas actuales emplean ultrasonidos, microondas o CO₂ supercrítico, todas ellas de elevado coste, por lo que se requieren procesos más económicos y sostenibles dentro de la Química Verde (Krichnavaruk *et al.*, 2007; Khoo *et al.*, 2021). Se sabe que la MSPD es una técnica extractiva sencilla que podría emplearse como alternativa a las citadas anteriormente.

La MSPD, dispersión de matriz en fase sólida (Matrix Solid-Phase Dispersión), es una técnica de extracción sencilla, rápida, escalable y sostenible, cuya versatilidad le permite adaptarse para la extracción de una amplia variedad de muestras (García-Jares *et al.*, 2017). Actualmente solo se ha realizado una investigación en la que se aplica la MSPD para la extracción de compuestos de interés en *Haematococcus pluvialis*, obteniéndose extractos ricos en carotenoides y ácidos grasos, mostrándose esta técnica como una alternativa respetuosa con el medioambiente (Castillo *et al.*, 2020). Esta técnica ha sido empleada en otras especies de microalgas obteniéndose buenas recuperaciones de carotenoides determinados por HPLC (Jin *et al.*, 2019).

5. Caracterización de los compuestos

Para llevar a cabo el análisis y caracterización de los carotenoides y ácidos grasos se emplearán diferentes técnicas cromatográficas. Las técnicas mayormente empleadas para la determinación de carotenoides y ácidos grasos son HPLC-DAD (High-Performance Liquid Chromatography Diode Array Detector) y GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry), respectivamente.

5.1. HPLC-DAD

La cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a detector de diodos permite la identificación y cuantificación de carotenoides de estructuras conocidas, gracias a la combinación de la separación cromatográfica aportada por el HPLC y a los espectros de absorción UV-visibles aportados por el DAD.

La cromatografía de líquidos es una técnica analítica cuyo fundamento se basa en la distribución de los compuestos entre una fase estacionaria sólida inmovilizada sobre la superficie interna de la columna cromatográfica y una fase móvil líquida, permitiendo así la separación los componentes de una mezcla. Las interacciones de los analitos con la fase estacionaria provocan un retraso en el tiempo de estos dependiendo de su naturaleza. Así, el tiempo de retención (t_r) es característico para cada compuesto.

HPLC ha mostrado ser una técnica eficiente en la separación de carotenoides y ésteres de carotenoides (Wingerath *et al.*, 1996). El acoplamiento HPLC-DAD se ha aplicado con éxito en la identificación de diferentes carotenoides presentes en frutas exóticas (Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya, 2004); así como en la caracterización de los carotenoides y ésteres de astaxantina presentes en aplanósporas rojas de *Haematococcus pluvialis* (Holtin *et al.*, 2009).

5.2. GC-MS

El acoplamiento de la cromatografía de gases a espectrometría de masas es una técnica analítica ampliamente utilizada hoy en día gracias a que aporta diferentes ventajas gracias a la mayor sensibilidad y especificidad de usar espectrometría de masas como detector, permitiendo identificar picos no resueltos y determinar estructuras moleculares. Este acoplamiento aumenta la confianza de los resultados de los análisis cualitativos y cuantitativos.

La cromatografía de gases es una técnica analítica cuyo fundamento se basa en la distribución de los compuestos entre una fase estacionaria sólida o líquida inmovilizada sobre la superficie interna de la columna cromatográfica y una fase móvil gaseosa llamada gas portador, para permitir la separación de los componentes de una mezcla.

El espectrómetro de masas está compuesto por tres elementos fundamentales: una fuente de ionización en la que la molécula se ioniza en alto vacío o a presión atmosférica, para generar un conjunto de iones, un analizador de masas que actúa a modo de filtro separando los iones según su relación masa/carga (m/z) y un detector que es capaz de identificar la presencia e intensidad de los iones. Así, se genera un espectro de masas que es único y característico para cada molécula. El cuadrupolo es uno de los analizadores más empleados y está formado por cuatro rodillos paralelos sometidos a una corriente continua y a un potencial de radiofrecuencia cuya variación modifica la trayectoria de los iones permitiendo su separación.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Este trabajo ofrece una visión comparada del contenido en compuestos bioactivos presentes en la microalga de agua dulce *Haematococcus pluvialis* a lo largo de diferentes fases de su ciclo celular, desde su estado vegetativo móvil, hasta aplanósporas cultivadas bajo diferentes condiciones de iluminancia y disponibilidad de CO₂.

De esta manera, resulta interesante la caracterización de los extractos de las diferentes fases de *Haematococcus pluvialis* y la cuantificación de su contenido en carotenoides y ácidos grasos. Así, los objetivos específicos que se proponen son:

- Analizar, identificar y cuantificar los carotenoides principales presentes en cultivos de *Haematococcus pluvialis* sometidos a diferentes condiciones de cultivo.
- Analizar, identificar y cuantificar los ácidos grasos principales presentes en cultivos de *Haematococcus pluvialis* sometidos a diferentes condiciones de cultivo.

Esto permitirá:

- Una mayor comprensión del papel de la astaxantina durante el periodo de enquistamiento en *Haematococcus pluvialis*.
- Estudiar fases celulares de *Haematococcus pluvialis* nunca investigadas.

Para lo cual, se procede a:

- Emplear una técnica de extracción dentro de la Química Verde que permita una fácil disrupción de las muestras, la MSPD.
- Caracterizar el contenido en carotenoides mediante el método cromatográfico de HPLC-DAD.
- Caracterizar el contenido en ácidos grasos mediante el método cromatográfico de GC-MS.

PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado se detallarán los materiales y métodos empleados en la obtención de la muestra y caracterización de esta, así como todo el proceso desde la obtención de la materia prima hasta el almacenamiento de los extractos.

1. Materiales e instrumentación

- Micropipetas de precisión de volúmenes entre 20-200 μL , 100-1000 μL y 1000-5000 μL .
- Puntas de micropipetas de precisión
- Pipetas Pasteur y peras de succión de goma
- Cartuchos de mini-MSPD de 2,5 mL
- Probetas de 10 mL
- Viales de 1,8 y 5 mL ámbar y viales de 10 mL transparentes.
- Cápsulas y septa para el sellado de los viales
- Encapsuladores y desencapsuladores
- Filtros PTFE 0,22 μm
- Mortero de vidrio
- Espátulas metálicas
- Soportes y pinzas
- Cronómetro
- Papel de aluminio
- Lana de vidrio
- Balanza analítica
- Vórtex
- Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

- Cromatógrafo de líquidos con detector de diodos
- Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas

2. Reactivos

- Patrones

Tabla 2. Patrones de carotenoides empleados.

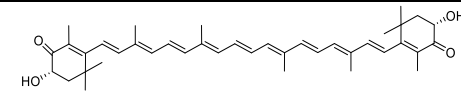
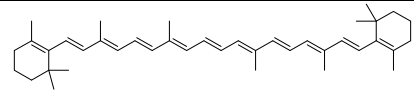
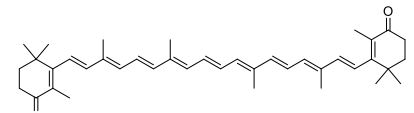
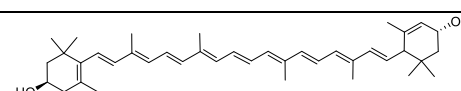
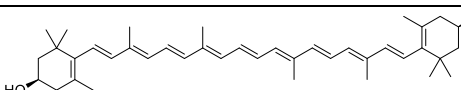
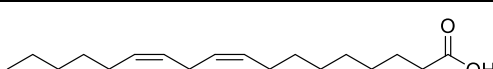
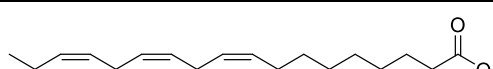
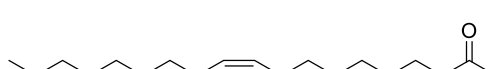
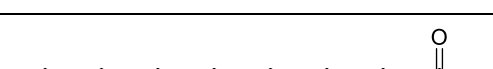
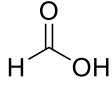

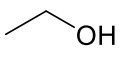
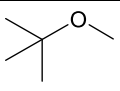
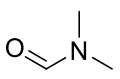
Compuesto	Número CAS	Pureza % (g/g)	Marca comercial	Estructura
Astaxantina	472-61-7	98,1%	<i>Biosynth Carbosynth</i>	
β -caroteno	7235-40-7	99,7%	<i>ThermoFisher</i>	
Cantaxantina	514-78-3	95,2 %	<i>Dr. Ehrenstorfer</i>	
Luteína	127-40-2	91,9%	<i>Biopurify</i>	
Zeaxantina	144-68-3	97,8%	<i>Biopurify</i>	

Tabla 3. Patrones de ácidos grasos empleados.

Compuesto	Número CAS	Pureza % (g/g)	Marca comercial	Estructura
Ácido linoleico	60-33-3	99,2%	<i>Sigma- Aldrich</i>	
Ácido linolénico	463-40-1	98,5%	<i>Sigma- Aldrich</i>	
Ácido oleico	112-80-1	99,6%	<i>Sigma- Aldrich</i>	
Ácido palmítico	57-10-3	99,9%	<i>Fluorochem</i>	

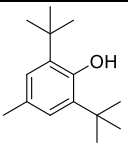
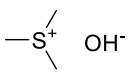
- Disolventes

Tabla 4. Disolventes empleados.

Compuesto	Número CAS	Pureza % (g/g)	Marca comercial	Estructura
Ácido fórmico	64-18-6	≥99%	<i>Scharlab</i>	
Agua	7732-18-5	≥99%	<i>Scharlab</i>	
Etanol	64-17-5	≥99%	<i>Scharlab</i>	
Metanol	67-56-1	≥99%	<i>Scharlab</i>	$\text{H}_3\text{C}-\text{OH}$
Metil tert-butil éter (MTBE)	1634-04-4	≥99%	<i>Merck</i>	
N,N-dimetilformamida (DMF)	68-12-2	≥99%	<i>Panreac</i>	

- Dispersante: arena 210-297 μm de tamaño de poro (marca *Sigma-Aldrich*)
- Reactivos

Tabla 5. Reactivos empleados.

Reactivo	Número CAS	Pureza % (g/g)	Marca comercial	Estructura
Butilhidroxitolueno (BHT)	128-37-0	99,9%	<i>ThermoFisher</i>	
Hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH)	17287-03-5	≥99%	<i>Sigma-Aldrich</i>	

3. Preparación de rectas de calibrado y disoluciones patrón

Para elaborar las rectas de calibrado de los carotenoides se prepararon los siguientes niveles de concentración: 0,5, 1, 5, 10 y 20 ppm, utilizando como disolvente DMF. Se realizan tres inyecciones de cada uno de ellos y se representa la intensidad (absorbancia a λ en el rango 440-480 nm) obtenida frente a la concentración (figura 2).

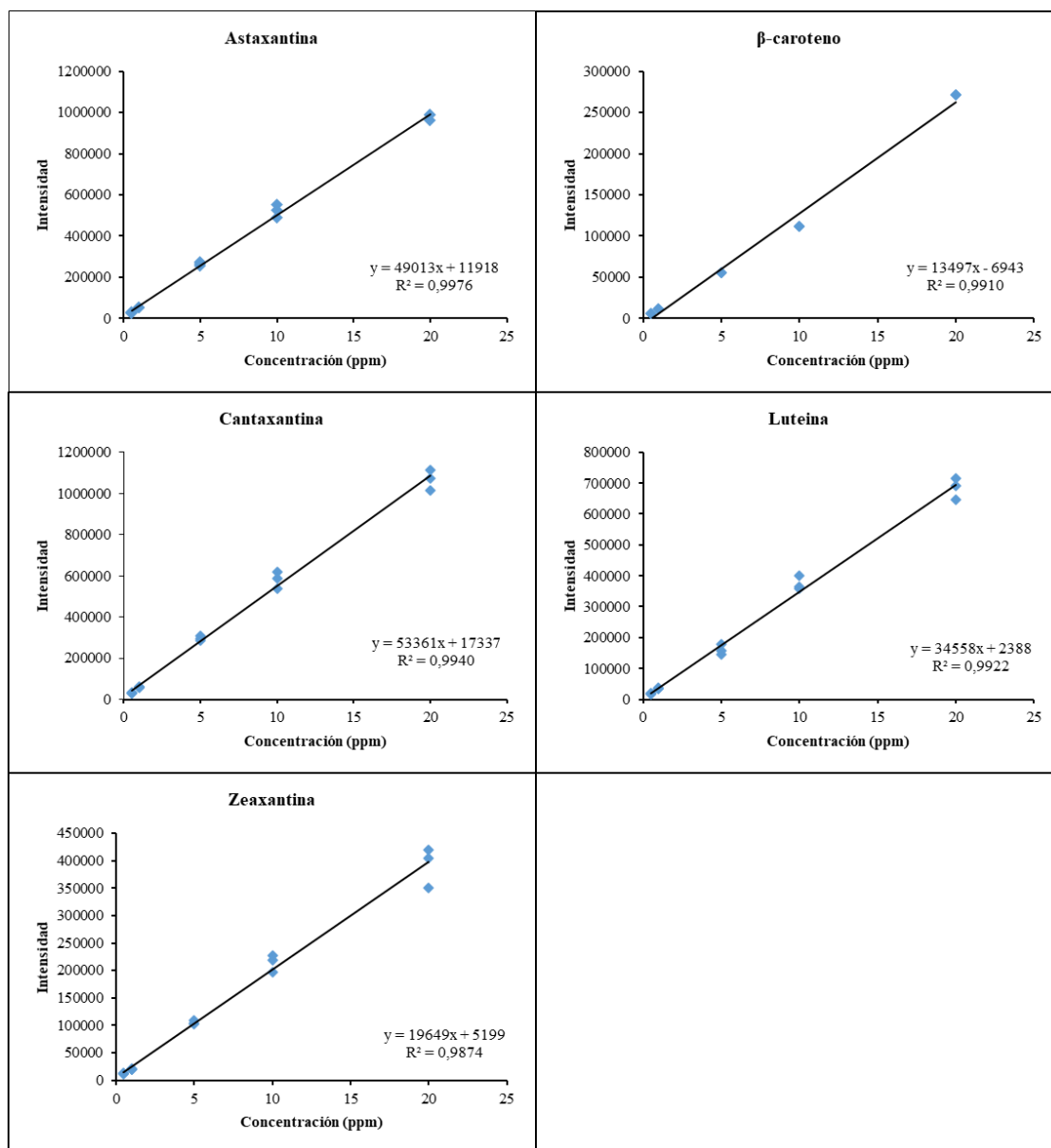


Figura 2. Curvas de calibrado para los carotenoides estudiados.

Para elaborar las rectas de calibrado de los ácidos grasos se prepararon los siguientes niveles de concentración: 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ppb, utilizando MTBE como disolvente. Se realizan dos inyecciones de cada uno de ellos

y se representa el área de pico obtenida para un ión de cuantificación seleccionado (SIM) frente a la concentración (figura 3).

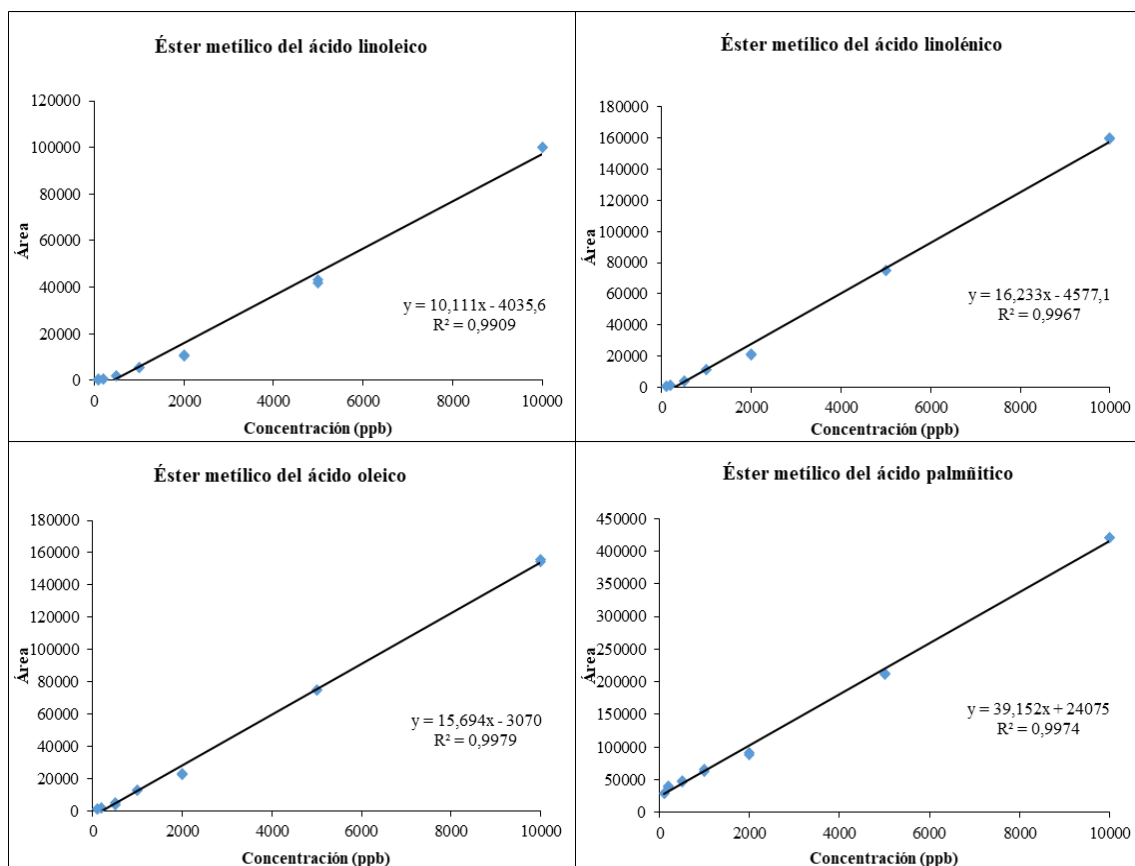


Figura 3. Curvas de calibrado para los ácidos grasos estudiados.

4. Muestras

En este trabajo se analizaron cultivos de *Haematococcus pluvialis* cepa CCMP34/7 de la colección del grupo AQUABIOTEC (GI-1209) del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Santiago de Compostela (CIBUS) en diferentes fases de su ciclo celular.

La metodología de cultivo comenzó inoculando la microalga en dos fotobiorreactores de 1L con una densidad de 1×10^5 células/mL en medio óptimo para *Haematococcus* (MOH) con una concentración inicial de nitrógeno de 4 mM. Los fotobiorreactores son botellas de vidrio con un tapón que mediante capilares introduce una corriente de aire y de CO₂, para esta última se ajustó el flujo para mantener un pH inferior a 7,8 y superior a 7,0. Se mantuvo la producción de biomasa durante ocho días

hasta llegar a una densidad de 1×10^6 células/mL, con ciclos circadianos de luz:oscuridad (12h:12h) (Domínguez *et al.*, 2019).



Figura 4. Fotobiorreactor de 1 L con fase vegetativa.

A continuación, tuvo lugar la fase de inducción, en la que el cultivo se dividió en fotobiorreactores de 80 mL sometidos a diferentes condiciones de aireación e iluminación. Al final de este diseño biológico, se centrifugaron los cultivos y se eliminó el agua para formar una pasta que servirá como materia prima para llevar a cabo las futuras extracciones. Estas muestras se guardaron en congelador a -20 °C protegidas de la luz para evitar la posible degradación de sus compuestos bioactivos.

5. Extracción

Para llevar a cabo la extracción de los carotenoides y ácidos grasos de las diferentes fases celulares de *Haematococcus pluvialis* se empleó la metodología mini-MSPD con jeringas de 2,5 mL, utilizando los parámetros óptimos estudiados anteriormente por el grupo de investigación para la microalga liofilizada. Sin embargo, esta optimización contemplaba una relación de masa de alga:dispersante 1:4, pero se tuvo que recurrir a una relación 1:8 porque la mezcla quedaba muy agregada debido a la humedad de la pasta en comparación con el alga liofilizada. Los parámetros de la extracción se resumen, a continuación, en la tabla 6.

Tabla 6. Parámetros utilizados para la extracción.

Muestra	Dispersante	Eluyente	Tiempo
0,1 g	0,8 g	5 mL	20 min

Como agente dispersante se empleó arena con tamaño de poro 210-297 μm y como eluyente etanol grado alimentario. El procedimiento consistió en pesar la masa de

la microalga y de la arena sobre un mortero de vidrio, sobre el que se realiza la disrupción durante 5 minutos, obteniéndose una mezcla homogénea. El interior de la jeringa se rellenó con un poco de lana de vidrio y de arena del mismo tamaño de poro a modo de filtro, sobre la cual se añadió la mezcla disruptada. A continuación, se coloca un poco de lana de vidrio sobre ella y se compacta para evitar caminos de preferencia del eluyente. Finalmente, se lava el mortero con el etanol que se empleará como disolvente y se procede a realizar la extracción en oscuridad, con ayuda de una lámpara roja, para evitar la degradación de los carotenoides. Cada una de las fases se extrae por triplicado. A continuación, se muestra un esquema de la técnica de extracción (figura 5).

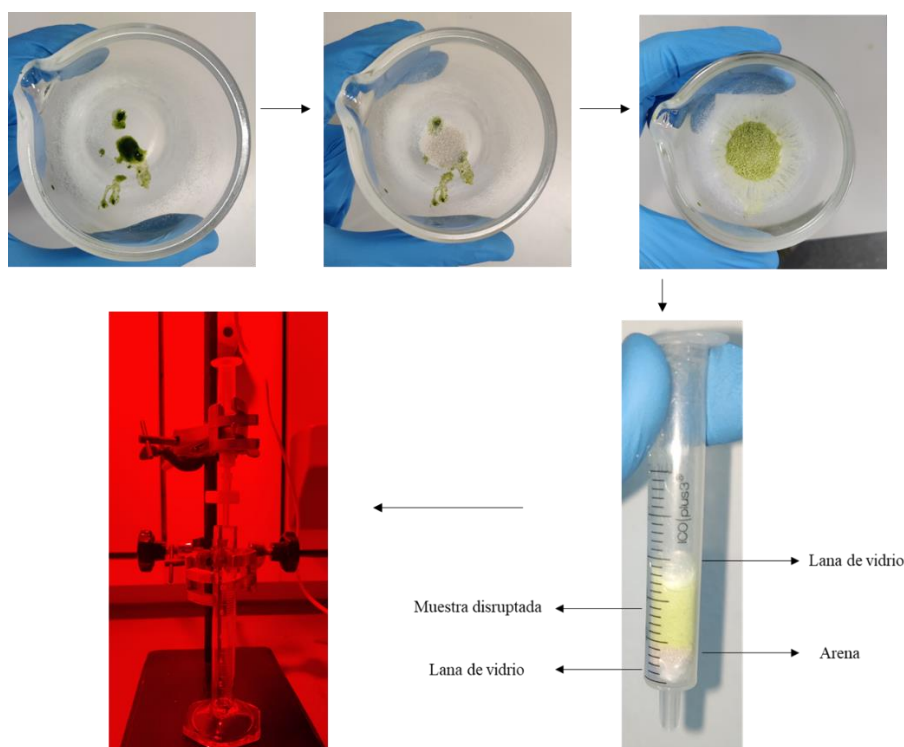


Figura 5. Esquema de la extracción vía mini-MSPD.

Para evitar la degradación de los extractos se añaden 0,1 mL de una disolución de BHT 11 g/mL sobre un volumen de 1 mL de cada extracto (Meléndez-Martínez *et al.*, 2006). Esta disolución se prepara pesando 22 mg de BHT y se disuelven en 2 mL de etanol grado alimentario. Los viales se guardan en congelador a -20 °C para el posterior análisis cromatográfico.

6. Análisis espectrofotométrico

Para la medición de la concentración de nitrato presente en el medio durante la fase de producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis*, así como para la medición de los carotenoides totales durante el periodo de enquistamiento bajo diferentes condiciones de cultivo, se empleó un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Omega UV-Vis (ultravioleta-visible). Por lo tanto, los análisis mostrados en este apartado tuvieron lugar antes de la extracción mini-MSPD.



Figura 6. Espectrofotómetro UV-Vis empleado en la medición de nitrato y carotenoides totales.

6.1. Medición de nitratos

El seguimiento de la cantidad de nitratos durante la producción de biomasa se realizó diariamente siguiendo el método espectrofotométrico de Collos *et al.* (1999) para la longitud de onda de 220 nm, y se muestra en la figura 7:

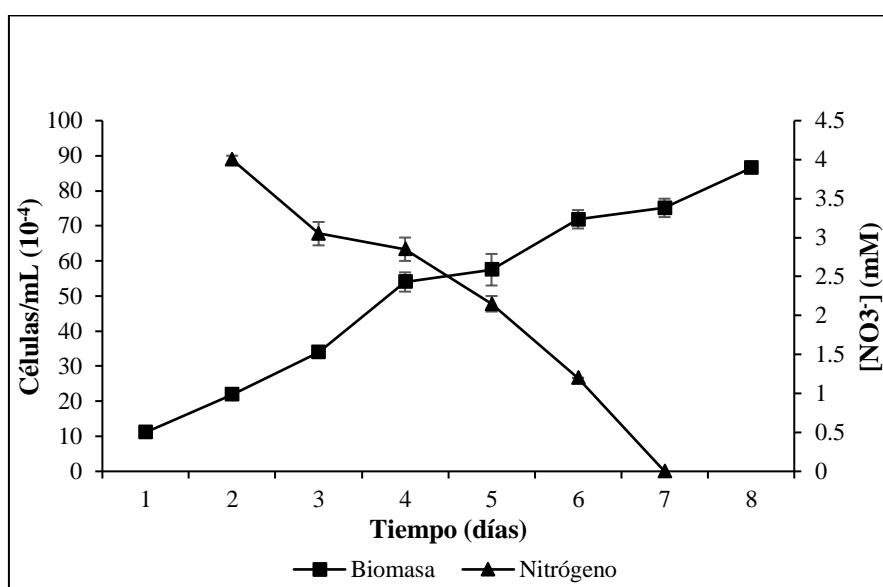


Figura 7. Evolución de la fase de producción de biomasa de *Haematococcus pluvialis* a medida que se consumen los nitratos del medio.

6.2. Medición de carotenoides

Una vez iniciada la fase de producción de aplanósporas tras el agotamiento de la fuente de nitrógeno, se realizó un seguimiento diario de la evolución de los carotenoides totales a lo largo de las diferentes fases celulares de *Haematococcus pluvialis* mediante el método espectrofotométrico de Lichtenhaler (1987) que emplea diferentes ecuaciones y longitudes de onda para medir las clorofilas a y b ($\lambda_1 = 663,2 \text{ nm}$ $\lambda_2 = 646,8 \text{ nm}$), y los carotenoides ($\lambda_3 = 470,0 \text{ nm}$). Los resultados de la evolución de las clorofilas no se muestran, ya que no son objetivo de este trabajo.

$$\text{Clorofila a (Ca)} = 12,25 * A_{663,2} - 2,79 * A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila b (Cb)} = 21,50 * A_{646,8} - 5,10 * A_{663,2}$$

$$\text{Carotenoides} = \frac{1000 * A_{470} - 1,82 * Ca - 85,02 * Cb}{198}$$

7. Análisis cromatográfico

7.1. HPLC-DAD

Para la identificación de los principales carotenoides se empleó un cromatógrafo Jasco con columna cromatográfica kinetex 5 μm C18 100Å. Incorpora un sistema de autoinyección AS-4150, bomba RHPLC PU-4180, horno para columnas CO-4060, interfaz LC-Net II/ADC y un detector de red de diodos (DAD) MD-4010. Se muestra, a continuación, en la figura 8.



Figura 8. Cromatógrafo de líquidos acoplado a detector de red de diodos (HPLC-DAD) empleado en el análisis de carotenoides.

Se toman 0,5 mL de los extractos con BHT guardados en congelador y se trasvasan a un vial ámbar de 1,8 mL haciéndolos pasar por un filtro PTFE de 0,22 μm . Estos nuevos 15 viales son los que se emplearán para el análisis HPLC-DAD.

Este equipo emplea una fase móvil que consta de una fase A compuesta por una disolución de ácido fórmico al 1% en agua, y una fase B compuesta por una disolución de ácido fórmico al 1% en metanol. La adquisición comienza con un gradiente 20:80 agua:metanol (%) hasta llegar a un 100% de la fase orgánica, y tras 15 minutos se retoma el gradiente inicial.

7.2. GC-MS

Los principales ácidos grasos presentes en los extractos de las diferentes fases celulares de *Haematococcus pluvialis* se analizaron con un cromatógrafo de gases Agilent 7890A, que dispone de un inyector automático Agilent 7693, acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C, que emplea como analizador de masas un cuadrupolo de triple eje. Para el control del equipo, así como para la adquisición y tratamiento de los datos, se empleó el software MSD ChemStation E.02.00.493. Se muestra a continuación, en la figura 9.



Figura 9. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) empleado en el análisis de los ácidos grasos.

Los extractos obtenidos vía mini-MSPD se someten a un proceso de derivatización, que consiste en la modificación química de un compuesto para obtener un derivado de estructura similar. En este caso, se empleó TMSH como agente derivatizante para obtener ésteres metílicos de los ácidos grasos para facilitar su análisis por el aumento

de la volatilidad de éstos (Gómez-Brandón *et al.*, 2008). A continuación, se describe el proceso.

Para llevar a cabo la derivatización, primero se evaporan los extractos a sequedad bajo corriente de N₂. A continuación, se reconstituyen con 500 µL de MTBE y se añaden 50 µL de derivatizante. Se mantiene en oscuridad durante 30 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se añaden 450 µL de MTBE para que el volumen final sea de 1 mL y se realiza el análisis GC-MS.

El inyector automático opera a una temperatura de 260 °C y el modo de inyección es de *splitless* pulsado empleando como gas portador Helio 99,999%. Dentro de la columna, de dimensiones 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, se encuentra una fase estacionaria de composición 5% polisilarileno y 95% polimetilsiloxano. El programa de temperaturas del horno empieza con 1 min a 60 °C, luego se incrementa en 20 °C/min hasta llegar a 150 °C, manteniéndose en esta temperatura durante 2 min, luego se incrementa en 10 °C/min hasta llegar a 290 °C, manteniéndose en esta temperatura durante 10,5 min. Así, el tiempo total del análisis es de 32 min. La línea de transferencia se encuentra a una temperatura de 290 °C, conectada a la fuente de ionización electrónica del espectrómetro de masas, a 300 °C, seguida del cuadrupolo de triple eje, a 150 °C.

El espectrómetro de masas permite trabajar con dos modos de adquisición diferentes: FULL SCAN, que realiza un barrido general de todas las masas dentro de unos límites especificados, y SIM (*Selected Ion Monitoring*), que permite el control de los iones seleccionados aumentando la selectividad y reduciéndose las interferencias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este trabajo ofrece una visión comparada del contenido en compuestos bioactivos presentes en la microalga de agua dulce *Haematococcus pluvialis* a lo largo de diferentes fases de su ciclo celular, desde su estado vegetativo móvil, hasta aplanósporas cultivadas bajo diferentes condiciones ambientales.

1. Diseño experimental biológico

Para llevar a cabo la fase producción de biomasa se cultivó la microalga durante 8 días hasta llegar a una densidad aproximada de 1×10^6 células/mL, momento en el cual se agotó la fuente de nitrógeno y dio comienzo la fase de inducción, en la que se produjeron las aplanósporas. Para ello, se dividió el cultivo en fotobiorreactores de 80 mL sometidos a diferentes condiciones de estrés, en las que variaron la iluminación y la aireación, realizándose el experimento por triplicado. Las etiquetas de la fase de inducción se muestran a continuación, en la tabla 7, y se recurrirá a ellas más adelante:

Tabla 7. Etiquetas de la fase de inducción.

	Sin aireación	Aire	Aire + CO₂
Luz Baja Intensidad 16 nmol quanta/m ² /s	BI0	BIA	BIC
Luz Alta Intensidad 140 nmol quanta/m ² /s	AI0	AIA	AIC

La iluminancia se midió con un luxómetro y para la conversión de lx (lux) a $\mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s}$ se utilizó el factor de conversión $1 \mu\text{mol quanta/m}^2/\text{s} = 51,2 \text{ lx}$ (Ginzburg, 1987). A continuación, se muestra una imagen del diseño para el último día del experimento (figura 10), y una visualización a nivel celular (figura 11).



Figura 10. Fotobiorreactores de 80 mL el último día del experimento. En la fila superior, de izquierda a derecha: B10, B1A y B1C. En la fila inferior, de izquierda a derecha: A10, A1A y A1C.

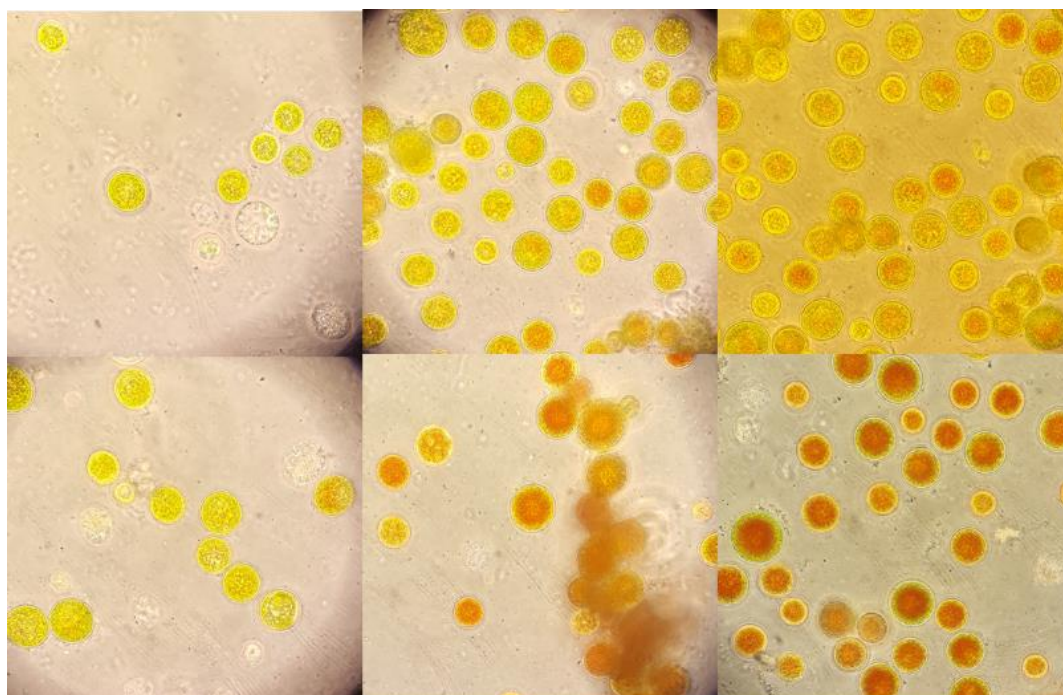


Figura 11. Células de *Haematococcus pluvialis* el último día del experimento bajo microscopio óptico con un aumento x1000 (x100 del objetivo y x10 del ocular). En la fila superior, de izquierda a derecha: B10, B1A y B1C. En la fila inferior, de izquierda a derecha: A10, A1A y A1C.

En las dos condiciones carentes de aireación (B10 y A10) se observa una baja densidad celular debido a un fenómeno de muerte celular. En B1A se observan

aplanósporas verdes con una pequeña tonalidad rojiza en algunas células, mientras que en BIC comienza a haber una moderada tonalidad rojiza. En AIC las células son rojas debido a la síntesis de astaxantina, pero en AIA hay una gran formación de grumos.

Durante el periodo de enquistamiento se llevó a cabo un estudio diario de la evolución de los carotenoides totales presentes para cada una de las diferentes condiciones a las que fueron sometidos los cultivos. Los resultados se muestran, a continuación, en la figura 12.

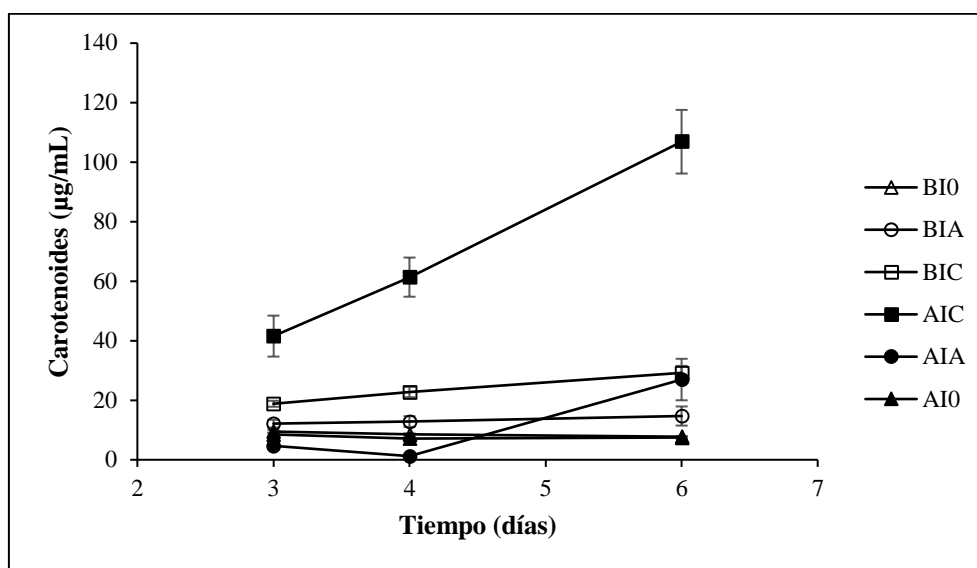


Figura 12. Evolución de los carotenoides durante los tres últimos días de la fase de inducción (µg/mL).

Para la cuantificación de los carotenoides solo se muestran los resultados de los tres últimos días del experimento debido a dificultades durante la extracción de los pigmentos. Así, se observa un incremento generalizado en la cantidad de carotenoides acumulada, evidenciando el proceso de carotenogénesis que tiene lugar durante el periodo de enquistamiento, especialmente para AIC, sometida a alta intensidad luminosa y a un aporte externo de CO₂. Para BIC se observa también un incremento a pesar de no estar sometida a elevada intensidad lumínica, gracias a la fuente de carbono externa. Para AIA la respuesta es confusa debido a la formación de grumos, pero se aprecia un incremento, mientras que en BIA tiene lugar una ligera acumulación. Para las condiciones carentes de aireación (B10 y AI0) no se observa un aumento significativo de los carotenoides.

Para llevar a cabo una cuantificación rigurosa de los diferentes carotenoides presentes en los cultivos de *Haematococcus pluvialis* se precisan técnicas cromatográficas. Para este análisis se rechazaron las condiciones carentes de aireación (BI0 y AI0) debido a una elevada muerte celular, y AIA por ser la única condición en la que se formaron grumos generando problemas durante su cultivo, además de experimentar también muerte celular. Por lo tanto, de la fase de inducción solo se recogieron BIA, BIC y AIC por ser las que de mayor interés biológico. Para acondicionar las muestras para los futuros análisis, se sometieron a centrifugación y, posteriormente, se eliminó la mayor cantidad de agua posible obteniéndose una pasta que se guardó en congelador a -20 °C. A continuación, se muestran estas tres condiciones previamente al acondicionamiento, observándose una clara diferencia en su color (figura 13).



Figura 13. Fases de inducción llevadas a análisis cromatográfico. De izquierda a derecha: BIA, BIC y AIC.

Además, también se recogieron una fase vegetativa móvil (FM) antes de entrar en el periodo de enquistamiento, y una fase de palmella en los momentos iniciales de la fase de inducción (PL) para observar la evolución de la carotenogénesis y de los ácidos grasos durante todo el proceso de enquistamiento.

2. Compuestos bioactivos

En este apartado se muestran los resultados de los ensayos realizados para la determinación de los carotenoides y ácidos grasos principales, en los que se emplearon un HPLC-DAD y un GC-MS, respectivamente.

2.1. Análisis de carotenoides

Los carotenoides representan la familia de compuestos bioactivos más estudiada en *Haematococcus pluvialis*. A su vez, los resultados de los ensayos que abordan el análisis de los factores modificadores de la concentración de estos compuestos en la microalga son objeto de discusión. Así pues, en el siguiente esquema (figura 14) se muestra la concentración porcentual de los principales carotenoides (astaxantina, luteína, zeaxantina y β -caroteno) en las diferentes fases del diseño experimental.

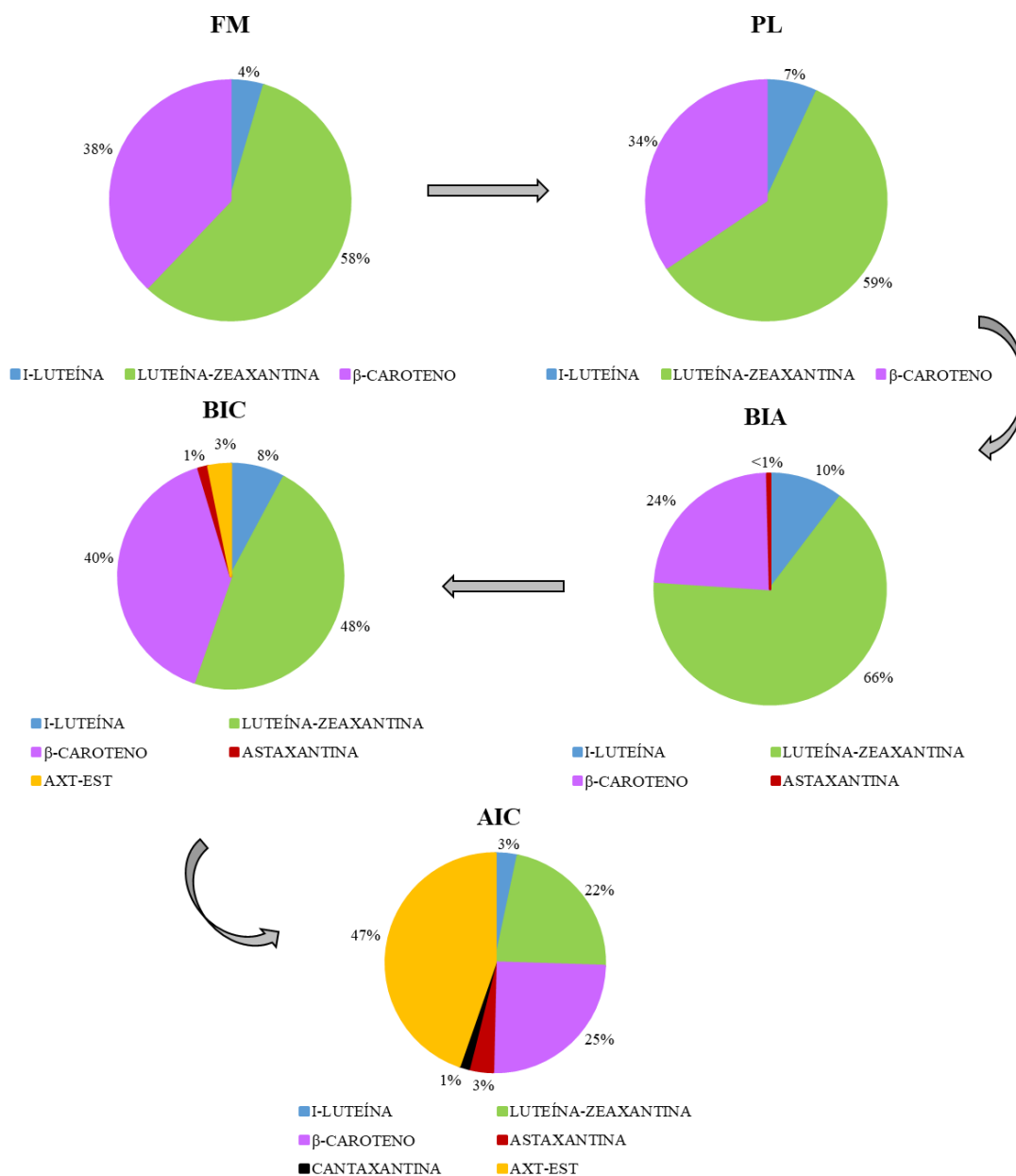


Figura 14. Concentración porcentual relativa a los principales carotenoides presentes en *Haematococcus pluvialis* a lo largo de las diferentes fases del proceso: fase móvil (FM), palmella (PL), baja intensidad lumínica en presencia de aire (BIA), baja intensidad lumínica en presencia de CO₂ (BIC), y alta intensidad lumínica en presencia de CO₂ (AIC). Siendo AXT-EST astaxantina esterificada.

En la figura 14 se representa la evolución de la concentración porcentual de los carotenoides principales desde el estado vegetativo móvil, seguido por la fase intermedia de palmella, hasta llegar a las fases de inducción en donde se generan las aplanósporas. La secuencia BIA → BIC → AIC muestra una aproximación en la fase de inducción desde BIA, que no estuvo sometida a ningún estrés que favoreciera la síntesis de astaxantina; siguiendo con BIC, sometida a un flujo de CO₂ externo; hasta llegar a AIC, cultivada bajo un flujo de CO₂ externo y alta intensidad lumínica, es decir, bajo las condiciones óptimas para la acumulación de astaxantina.

Así, respecto a las condiciones previas al periodo de enquistamiento, las fases FM y PL, que se corresponden con la microalga en su estado vegetativo y en fase de palmella, respectivamente, muestran perfiles similares, ya que en palmella la fase estacionaria se encuentra en un estado incipiente. Dentro de los principales carotenoides cuantificados en estas fases de la microalga resalta la respuesta conjunta de los isómeros luteína-zeaxantina. Esta cuantificación se muestra de forma conjunta debido a la similar afinidad por parte de estos compuestos con la fase estacionaria utilizada, lo cual hace compleja su separación cromatográfica. El β-caroteno presenta un perfil similar siendo escasamente mayor en el caso de FM. A su vez, en una menor proporción se detalla la respuesta de un isómero de luteína.

En cuanto a las fases de inducción, se observa una clara diferencia. BIA muestra un perfil semejante a las fases anteriores, pero con una mayor proporción del aporte luteína-zeaxantina en comparación con el β-caroteno. Sin embargo, la mayor diferencia se evidencia en el comienzo de la síntesis de astaxantina debida al poco CO₂ que pudo captar del aire. En BIC se observa como la proporción de luteína-zeaxantina va disminuyendo, y comienza la síntesis y acumulación de astaxantina, sin embargo, no hay grandes diferencias entre su forma libre y esterificada. Finalmente, AIC muestra el aumento evidente de la síntesis de astaxantina, presentándose mayoritariamente en forma esterificada. Al mismo tiempo se observa una disminución discreta de la respuesta conjunta luteína-zeaxantina y β-caroteno; y también la aparición de la cantaxantina, no detectada en ninguna de las otras condiciones.

Tabla 8. Concentración de los principales carotenoides presentes en las diferentes fases celulares de *Haematococcus pluvialis* (mg/g).

Compuesto	FM	PL	BIA	BIC	AIC
I-Luteína	0,15	0,26	0,35	0,41	0,29
Lut-Zea	1,90	2,17	2,20	2,46	1,95
B-caroteno	1,25	1,27	0,79	2,08	2,19
Astaxantina	n.d	n.d	0,01	0,07	0,31
Axt-Est	n.d	n.d	n.d	0,17	3,93
Cantaxantina	n.d	n.d	n.d	n.d	0,13
TOTAL	3,30	3,70	3,34	5,19	8,79

En la tabla 8 se observa cómo avanza el proceso de carotenogénesis a medida que *Haematococcus pluvialis* entra en la fase estacionaria, siendo cada vez mayor la concentración de carotenoides hasta llegar al óptimo de síntesis y acumulación de astaxantina, excepto para la fase BIA. Para esta condición hay una menor concentración total de carotenoides debido, principalmente, a un proceso de muerte celular ocurrido por el aumento del pH, ya que no estuvo sometido a una corriente de CO₂ externa que pudiera regularlo, elevándose hasta valores de 9. Sin embargo, para el resto de las condiciones, con pH controlado en el rango 7,0-7,8, se observa claramente como la concentración total de carotenoides se incrementa hasta llegar a un valor máximo en AIC.

En los procesos donde se induce la síntesis de astaxantina en *Haematococcus pluvialis*, las concentraciones de β -caroteno muestran valores mínimos (Shah *et al.*, 2016). Esto resulta contradictorio con lo aquí presentado en AIC. Esta diferencia puede ser debida a que la fase de inducción se detuvo antes de que la microalga pudiera acumular el máximo de astaxantina, quedando las células rojas rodeadas de una corona verde (figura 15), sugiriéndose que este β -caroteno acabaría convirtiéndose en astaxantina a través de una determinada ruta sintética. Los efectos de detener la fase de inducción prematuramente también se pueden ver reflejados en la cantidad porcentual de astaxantina esterificada respecto a la total (libre y esterificada), que es del 92,6%, frente al 95% que se puede encontrar en la bibliografía (Chen *et al.*, 2014). Esto es lógico, ya que se observa un incremento de la concentración de astaxantina esterificada a medida que el sistema se acerca a las condiciones óptimas para su acumulación, por lo que detener el proceso prematuramente aportaría valores inferiores.

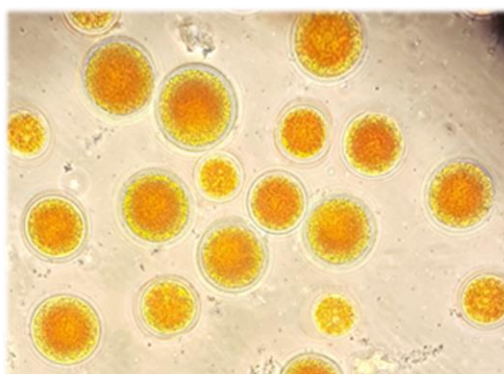


Figura 15. Células de AIC bajo microscopio óptico con aumento x1000 (x100 de objetivo y x10 de ocular).

A continuación, en la figura 16, se muestra un cromatograma obtenido para el extracto AIC, por ser la fase más representativa, ya que aparecen todos los carotenoides analizados en mayor concentración, mientras que en la figura 17 se muestra un cromatograma obtenido para aplanósporas rojas que muestra los ésteres de astaxantina principales (Holtin *et al.*, 2009).

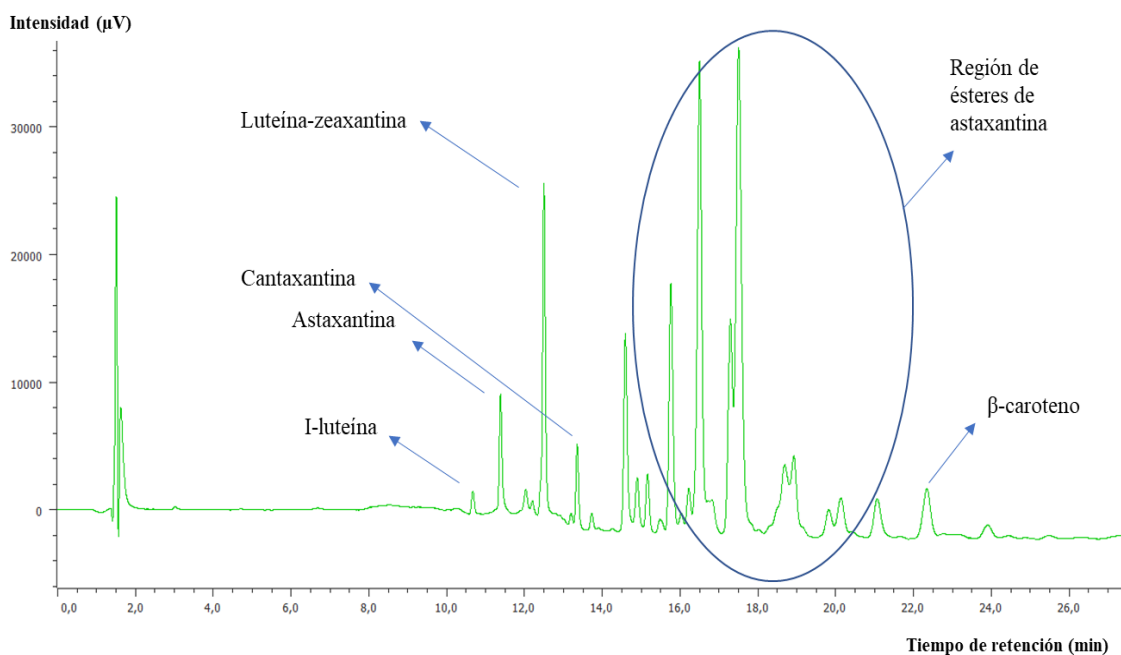


Figura 16. Cromatograma de carotenoides obtenido para un extracto de AIC.

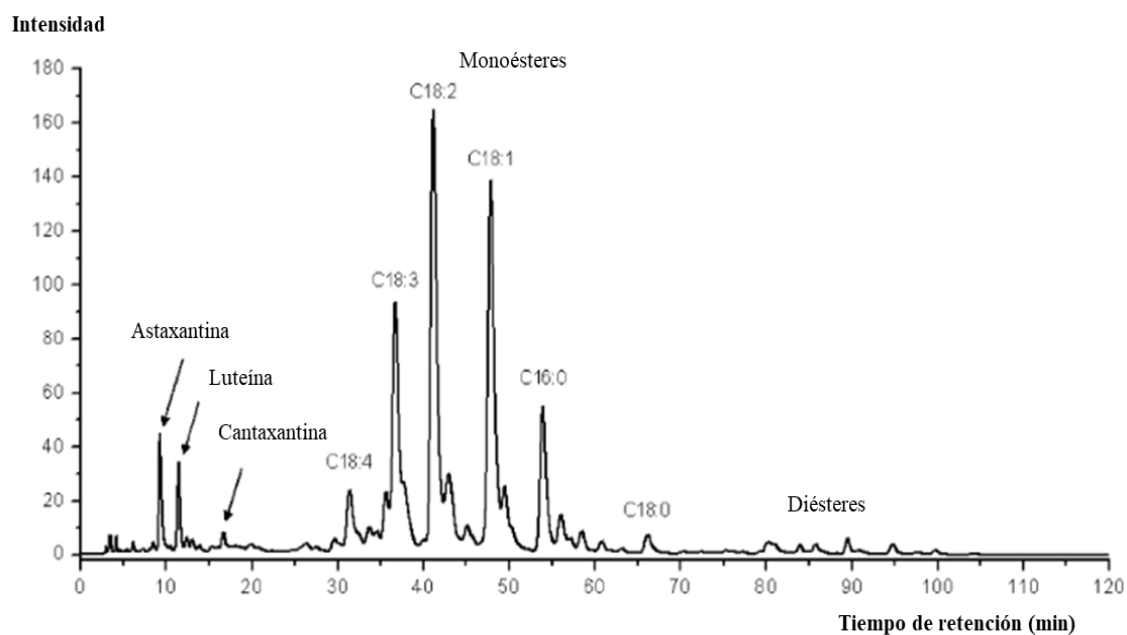


Figura 17. Cromatograma de carotenoides obtenido para aplanósporas rojas en el que se muestran los ésteres de astaxantina. Tomado y modificado de Holtin *et al.*, 2009.

El cromatograma obtenido para AIC presenta los mismos perfiles de carotenoides y ésteres de astaxantina que se obtuvieron en investigaciones anteriores empleando también un HPLC-DAD (Holtin *et al.*, 2009). A continuación, en la tabla 9, se muestra la identificación de los principales carotenoides identificados.

Tabla 9. Identificación de los principales carotenoides presentes en un extracto AIC.

Compuesto	t_r muestra (min)	t_r patrones (min)	Coefficiente de correlación, R^2	λ (nm)
Astaxantina	11,373	11,377	0,956	476
Cantaxantina	13,343	13,313	0,990	476
Luteína	12,487	12,470	0,9995	440
Zeaxantina	12,487	12,530	0,978	440
B-caroteno	22,330	22,063	0,996	450

Como se puede detallar en la tabla 9, los valores de los tiempos de retención de los patrones de los isómeros luteína y zeaxantina muestran una diferencia de tan solo 0,06 minutos. Esta pequeña diferencia hace compleja su identificación individual en la matriz analizada. Diversos trabajos se han enfocado en la separación de estos isómeros empleando columnas cromatográficas de C30, requiriendo altos tiempos de análisis y grandes volúmenes de disolvente, lo cual vuelve compleja su implementación (Schlatterer *et al.*, 2006). Esta razón, aunada a que se espera una respuesta análoga de los isómeros en la microalga, hace que se decida trabajar con su respuesta conjunta, siendo dicha cuantificación conjunta suficiente para el objetivo del trabajo.

Para justificar la identificación del isómero de la luteína y de los tres ésteres de astaxantina que se pudieron cuantificar, se recurre a la semejanza visual y a los coeficientes de correlación para los espectros de absorción obtenidos para dichos compuestos, tal y como se muestra, a continuación, en la figura 18.

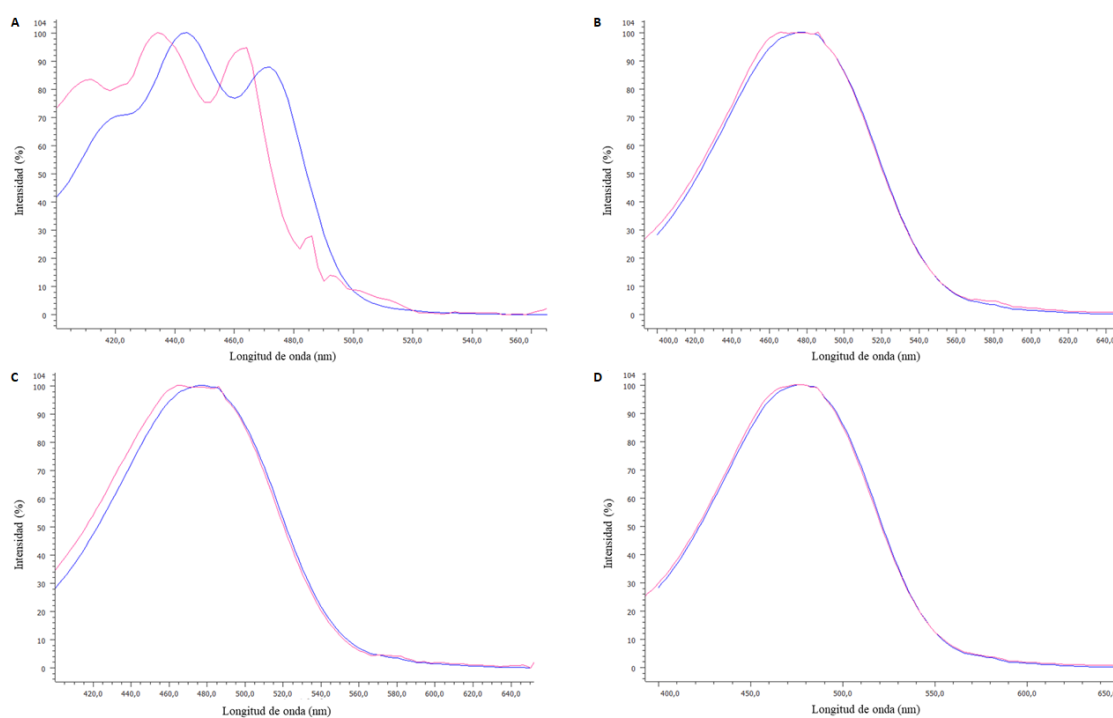


Figura 18. Superposición de los espectros de absorción de un extracto AIC (rosa) y el patrón (azul). A, isómero de luteína. B, C y D, ésteres de astaxantina.

El isómero de la luteína se comporta en las distintas fases del diseño biológico de manera semejante a la luteína, aunque su tiempo de retención es 2 minutos menor y el coeficiente de correlación entre espectros es moderado ($R^2 = 0,917$), lo que indica una

estructura isomérica más polar. De todos modos, no puede descartarse por completo que no sea un isómero de la luteína, sino otro carotenoide. En cuanto a los ésteres de astaxantina, presentan una elevada concordancia visual y los coeficientes de correlación son altos, $>0,998$, y, además, el perfil de estos compuestos es semejante al que se puede encontrar en la bibliografía (Ranga *et al.*, 2009).

Debido al incremento en la cantidad de astaxantina esterificada con ácidos grasos en AIC, así como para ofrecer una visión contrastada de los principales ácidos grasos en las diferentes fases del diseño biológico, resulta interesante y necesario su estudio.

2.2. Análisis de ácidos grasos

El contenido lipídico en aplanósporas de *Haematococcus pluvialis* puede llegar a suponer hasta el 35% en peso seco (Butler *et al.*, 2017), el cual, al igual que los carotenoides, se ve influenciado por los diversos estados que presenta la microalga. De esta manera, se procede a caracterizar los extractos tras su derivatización, mostrándose un cromatograma modelo (Figura 19) en donde se pueden apreciar la mayor concentración de carotenoides, así como los espectros de masas experimental y teórico para uno de los ácidos grasos identificados (figuras 20A y 20B, respectivamente).

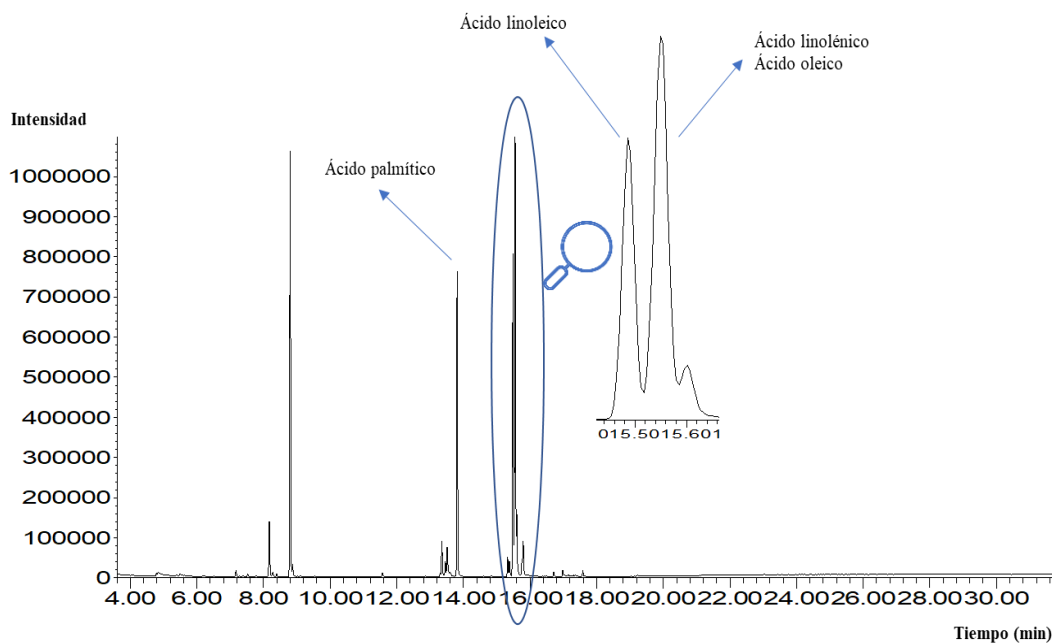


Figura 19. Cromatograma de ácidos grasos obtenido para un extracto de AIC.

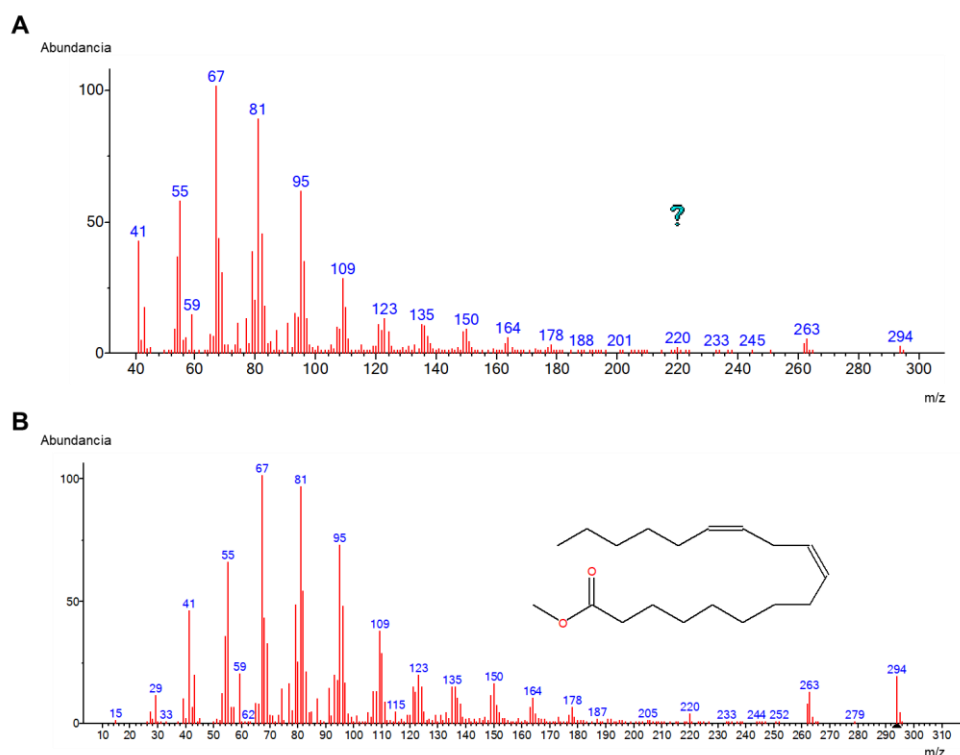


Figura 20. A, espectro de masas experimental para el ácido linoleico obtenido de un extracto AIC. B, espectro de masas teórico para el ácido linoleico.

En el método de análisis por GC-MS, se determinaron el límite de detección instrumental (LDI), el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) para los principales ácidos grasos. El LDI es la mínima cantidad de analito que es capaz de detectar el equipo, independientemente de las muestras que se utilicen, para su determinación se emplea un nivel de concentración del calibrado. Por definición, es la concentración de compuesto presente en el calibrado con una relación señal/ruido = 3 ($S/R = 3$), calculada en altura en este caso. El LOD es la cantidad mínima de analito presente en la muestra que se puede detectar, y se calcula como aquella concentración de compuesto presente en la muestra con una relación $S/R = 3$. El LOQ es la cantidad mínima de analito presente en la muestra que el equipo puede cuantificar, y se calcula como aquella concentración que tiene una relación $S/R = 10$. Los resultados se muestran en la tabla 10, junto a la relación masa/carga (m/z) y el tiempo de retención (t_R).

Tabla 10. Identificación de los principales ácidos grasos para un extractor AIC. Valores en negrita indican el ión de cuantificación. Valores entre paréntesis indican la abundancia de cada ión.

t_r (min)	Ácido graso	m/z	LDI (ppb)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
13,812	Ácido palmítico	74 (100), 87 (73), 43(25), 55(21)	7	13	42
15,485	Ácido linoleico	81 (100), 67 (114), 95 (70), 294 (3,0)	21	61	204
15,544	Ácido linolénico	79 (100), 95 (51), 108 (31), 292 (0,9)	23	52	173
15,544	Ácido oleico	55 (100), 74 (25), 83 (21), 264 (1,6)	37	67	222

A continuación, en la figura 20, se ofrece una visión comparada de los ácidos grasos principales encontrados en las diferentes fases del ciclo celular de *Haematococcus pluvialis*:

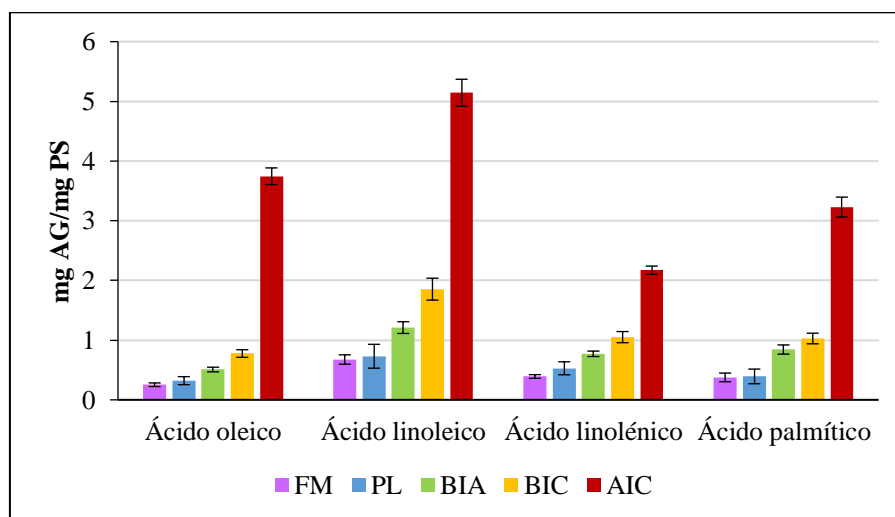


Figura 21. Visión comparada de la concentración de ácidos grasos, siendo AG ácidos grasos y PS peso seco.

En esta gráfica se observa como los principales ácidos grasos, de las familias omega-3 (ácido linolénico), omega-6 (ácido linoleico) y omega-9 (ácido oleico), y el ácido palmítico, se encuentran más concentrados en las fases de inducción que en las fases previas al periodo de enquistamiento, evidenciando la síntesis de sustancias de

reserva durante la fase estacionaria. La fase vegetativa y de palmella, FM y PL, respectivamente, presentan una concentración similar para todos los ácidos grasos, sin embargo, a medida que aumenta la disponibilidad de CO₂ y la intensidad lumínica, la cantidad de ácidos grasos también. Así, para el paso BIA → BIC se observa un aumento debido al aporte externo de carbono, y para BIC → AIC se manifiesta el efecto de la alta intensidad lumínica, incrementándose de manera patente los niveles de ácidos grasos, teniendo un efecto similar al observado en la acumulación de astaxantina, por lo que podría haber una relación de dependencia entre ambos procesos.

Así, debido a que BIC y AIC son las condiciones en las que más astaxantina y ácidos grasos se acumularon, se estudió la relación entre sus concentraciones para comprender mejor el papel de este carotenoide durante el enquistamiento. Si esta relación se mantuviera constante, jugaría un papel exclusivamente de sustancia de reserva ligada a los ácidos grasos. Los resultados se muestran, a continuación, en la tabla 11:

Tabla 11. Relación astaxantina/ácidos grasos para BIC y AIC (mg/mg).

Astaxantina/ácido graso	BIC	AIC
Ácido oleico	0,31	1,13
Ácido linoleico	0,13	0,82
Ácido linolénico	0,23	1,95
Ácido palmítico	0,23	1,31

Estos resultados muestran que la relación astaxantina/ácidos grasos no se mantiene constante, ya que se produce una mayor acumulación del carotenoide en AIC debido a que el cultivo estuvo sometido a elevada intensidad luminosa, evidenciando su papel como sustancia fotoprotectora. Por lo tanto, la astaxantina no se comporta exclusivamente como una sustancia de reserva; sin embargo, el hecho de que se acumule incluso en condiciones de luz limitante, impidiendo obtener aplanósporas verdes totalmente libres de este carotenoide, permite rechazar también su papel como sustancia exclusivamente fotoprotectora, sugiriéndose así una doble función, como sustancia fotoprotectora y de reserva. Así, habría una ruta biosintética en la que la acumulación de

ácidos grasos arrastraría la síntesis de astaxantina, y una ruta que solo tendría lugar cuando la microalga se somete a elevada intensidad luminosa, independiente de los ácidos grasos.

CONCLUSIONES

1. Conclusiones

La metodología de extracción mini-MSPD, ha demostrado tener éxito con todas las fases celulares, desde la vegetativa hasta las de enquistamiento. Esto hace a la mini-MSPD una alternativa eficiente para la obtención de extractos ricos en compuestos bioactivos de *Haematococcus pluvialis*, que rindieron unos resultados excelentes en la cuantificación de carotenoides y de ácidos grasos.

Los resultados de la cuantificación de carotenoides mostraron que en las fases previas al enquistamiento abundan la luteína-zeaxantina y el β -caroteno, mientras que a medida que avanza la fase estacionaria se sintetiza astaxantina. La acumulación de este carotenoide es máxima en las aplanósporas sometidas a alta iluminancia y aporte de CO₂ externo, especialmente en su forma esterificada con ácidos grasos. Además, es en esta condición de cultivo en la única que se detectó cantaxantina.

Los principales ácidos grasos identificados pertenecen a las familias omega-3 (ácido linolénico), omega-6 (ácido linoleico) y omega-9 (ácido oleico), así como el ácido palmítico. Su síntesis se incrementa a medida que avanza el proceso de enquistamiento y aumenta la iluminancia y disponibilidad de CO₂.

Estos resultados indujeron a pensar que podría haber una relación entre la astaxantina y los ácidos grasos. Así, el estudio de su relación reveló una doble función de la astaxantina durante el periodo de enquistamiento de *Haematococcus pluvialis*, como sustancia fotoprotectora y como sustancia de reserva ligada a ácidos grasos.

2. Conclusión

A metodoloxía de extracción mini-MSPD, demostrou ter éxito con todas as fases celulares, dende a vexetativa ata as de enquistamento. Isto fai á mini-MSPD unha alternativa eficiente para a obtención de extractos ricos en compostos bioactivos de *Haematococcus pluvialis*, que renderon uns resultados excelentes na cuantificación de carotenoides e ácidos grasos.

Os resultados da cuantificación de carotenoides mostraron que nas fases previas ao enquistamento abundan a luteína-zeaxantina e o β -caroteno, mentres que a medida que avanza a fase estacionaria sintetízase astaxantina. A acumulación deste carotenoide é

máxima nas aplanósporas sometidas a alta iluminancia e aporte de CO₂ externo, especialmente na súa forma esterificada con ácidos grasos. Ademais, é nesta condición de cultivo na única que se detectou cantaxantina.

Os principais ácidos grasos identificados pertencen ás familias omega-3 (ácido linolénico), omega-6 (ácido linoleico) e omega-9 (ácido oleico), así como o ácido palmítico. A súa síntese incrementase a medida que avanza o proceso de enquistamento e aumenta a iluminancia e dispoñibilidade de CO₂.

Estos resultados levaron a pensar que podería haber unha relación entre a astaxantina e os ácidos grasos. Así, o estudo da súa relación revelou unha dobre función da astaxantina durante o período de enquistamento de *Haematococcus pluvialis*, como sustancia de fotoprotectora e como sustancia de reserva ligada a ácidos grasos.

3. Conclusions

The mini-MSPD extraction methodology, has proven to be successful with all cell stages, from vegetative to cyst stages. This makes mini-MSPD an efficient alternative for obtaining extracts rich in bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis*, which yielded excellent results in the quantification of carotenoids and fatty acids.

The results of carotenoid quantification showed that lutein-zeaxanthin and β -carotene are abundant in the pre-encystation phases, while astaxanthin is synthesised as the stationary phase progresses. The accumulation of this carotenoid is maximal in aplanospores subjected to high illuminance and external CO₂ supply, especially in its fatty acid esterified form. Moreover, it is only in this culture condition that canthaxanthin was detected.

The main fatty acids identified belong to the omega-3 (linolenic acid), omega-6 (linoleic acid) and omega-9 (oleic acid) families, as well as palmitic acid. Their synthesis increases as the encystation process progresses and illuminance and CO₂ availability increase.

These results suggested that there might be a relationship between astaxanthin and fatty acids. Thus, the study of their relationship revealed a dual function of astaxanthin during the encystation period of *Haematococcus pluvialis*, both as a photoprotective substance and as a reserve substance bound to fatty acids.

BIBLIOGRAFÍA

- Ambati, R. R., Moi, P. S., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. *Marine Drugs* **12**, 128–152.
- Azevedo-Meleiro, C. H., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2004). Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis* **17**, 385–396.
- Butler, T. O., Mcdougall, G. J., Campbell, R., Stanley, M. S., & Day, J. G. (2017). Media screening for obtaining *Haematococcus pluvialis* red motile macrozooids rich in astaxanthin and fatty acids. *Biology* **7**, 2–14.
- Casagli, F., Zuccaro, G., Bernard, O., Steyer, J. P., & Ficara, E. (2021). ALBA: A comprehensive growth model to optimize algae-bacteria wastewater treatment in raceway ponds. *Water Research* **190**, 116734–116748.
- Castillo, A., Pereira, S., Otero, A., Fiol, S., Garcia-Jares, C., & Lores, M. (2020). Matrix solid-phase dispersion as a greener alternative to obtain bioactive extracts from: *Haematococcus pluvialis*. Characterization by UHPLC-QToF. *RSC Advances* **10**, 27995–28006.
- Cerón, M. C., García-Malea, M. C., Rivas, J., Acien, F. G., Fernandez, J. M., Del Río, E., Guerrero, M. G., & Molina, E. (2006). Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 1112–1119.
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., & Solovchenko, A. (2014). Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the white sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs* **12**, 4504–4520.
- Chen, G., Wang, B., Han, D., Sommerfeld, M., Lu, Y., Chen, F., & Hu, Q. (2014). Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *The Plant Journal* **81**, 95–107.
- Collos, Y., Mornet, F., Sciandra, A., Waser, N., Larson, A., & Harrison, P. J. (1999). An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *Journal of Applied Phycology* **11**, 179–184.

- Cordero, B., Otero, A., Patiño, M., Arredondo, B. O., & Fabregas, J. (1996). Astaxanthin production from the green alga *Haematococcus pluvialis* with different stress conditions. *Biotechnology Letters* **18**, 213–218.
- Dissing, B. S., Nielsen, M. E., Ersbøll, B. K., & Frosch, S. (2011). Multispectral imaging for determination of astaxanthin concentration in salmonids. *PLOS ONE* **6**, 19032–19039.
- Domínguez, A., Fábregas, J., & Otero, A. (2006). Astaxantina, el oro rojo de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Algas* **35**, 4–8.
- Domínguez, A., Pereira, S., & Otero, A. (2019). Does *Haematococcus pluvialis* need to sleep? *Algal Research* **44**, 101722–101727.
- Elliott, A. M. (1934). Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Archiv Für Protistenkunde* **82**, 250–272.
- Fábregas, J., Domínguez, A., García-Álvarez, D., Lamela, T., & Otero, A. (1998). Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Letters* **20**, 623–626.
- Fábregas, J., Otero, A., Maseda, A., & Domínguez, A. (2001). Two-stage cultures for the production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology* **89**, 65–71.
- Fan, L., Vonshak, A., Zarka, A., & Boussiba, S. (1998). Does astaxanthin protect *Haematococcus* against light damage? *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* **53**, 93–100.
- Garcia-Jares, C., Sanchez-Nande, M., Lamas, J. P., & Lores, M. (2017). Profiling the Fatty Acids Content of Ornamental Camellia Seeds Cultivated in Galicia by an Optimized Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction. *Bioengineering* **4**, 87–96.
- Ginzburg, M. (1988). *Dunaliella*: A Green Alga Adapted to Salt. *Advances in Botanical Research* **14**, 93–183.
- Gómez-Brandón, M., Lores, M., & Domínguez, J. (2008). Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **392**, 505–514.
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology* **21**, 210–216.
- Hagen, C., Siegmund, S., & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology* **37**, 217–226.

- Holtin, K., Kuehnle, M., Rehbein, J., Schuler, P., Nicholson, G., & Albert, K. (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI)MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395**, 1613–1622.
- Jin, G., Liu, Y., Xue S., Meng, Y., Yan, J., Yang, F., Guo, Z., Zhu, J., & Liang, X. (2019). Determination of Three Carotenoids in Microalgae by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia* **82**, 1593–1601.
- Khoo, K.S., Ooi, C.W., Chew, K.W., Foo, S.C., Lim, J.W., Tao, Y., Jiang, N., Ho, S.H., & Show, P.L. (2021). Permeabilization of *Haematococcus pluvialis* and solid-liquid extraction of astaxanthin by CO₂-based alkyl carbamate ionic liquids. *Chemical Engineering Journal* **411**, 128510–128519.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., & Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 867–873.
- Krichnavaruk, S., Shotipruk, A., Goto, M., & Pavasant, P. (2007). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Bioresource Technology* **99**, 5556-5560.
- 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. *Ecological Engineering* **90**, 244–250.
- Lei, A., Chen, H., Shen, G., Hu, Z., Chen, L., & Wang, J. (2012). Expression of fatty acid synthesis genes and fatty acid accumulation in *Haematococcus pluvialis* under different stressors. *Biotechnology for Biofuels* **5**, 18–28.
- Lemoine, Y., Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research* **106**, 155–177.
- Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances* **29**, 568–574.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**, 350–382.
- Lorenz, R. T., & Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus microalgae* as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* **18**, 160–167.

- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2006). HPLC analysis of geometrical isomers of lutein epoxide isolated from dandelion (*Taraxacum officinale* F. Weber ex Wiggers). *Phytochemistry* **67**, 771–777.
- Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and Applied Chemistry* **63**, 141–146.
- Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional applications. *Marine Drugs* **18**, 459–480.
- Otero, P., Kumar Saha, S., Mc Gushin, J., Moane, S., Barron, J., & Murray, P. (2017). Identification of optimum fatty acid extraction methods for two different microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Haematococcus pluvialis* for food and biodiesel applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **409**, 4659–4667.
- Pereira, S., & Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal research* **51**, 102027–102037.
- Ranga, R., Sarada, A. R., Baskaran, V., & Ravishankar, G. A. (2009). Identification of carotenoids from green alga *Haematococcus pluvialis* by HPLC and LC-MS (APCI) and their antioxidant properties. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**, 1333–1341.
- Santos, M.F. y Mesquita, J.F., (1984). *Cytologia* **49**, 215–28.
- Sarada, R., Tripathi, U., & Ravishankar, G. A. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry* **37**, 623–627.
- Schlatterer, J., & Breithaupt, D. E. (2006). Xanthophylls in commercial egg yolks: Quantification and identification by HPLC and LC-(APCI)MS using a C30 phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2267–2273.
- Shah, M. M. R., Liang, Y., Cheng, J. J., & Daroch, M. (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science* **7**, 531–558.
- Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., & Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters* **16**, 133–138.
- Vershinin, A. (1999). Biological functions of carotenoids - Diversity and evolution. *BioFactors* **10**, 99–104.

Wingerath, T., Stahl, W., Kirsch, D., Kaufmann, R., & Sies, H. (1996). Fruit Juice Carotenol Fatty Acid Esters and Carotenoids As Identified by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 2006–2013.

Yuan, J.-P., & Chen, F. (2000). Purification of trans-astaxanthin from a high-yielding astaxanthin ester-producing strain of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Food Chemistry* **68**, 443–448.