

ASPECTOS TEÓRICOS DE LA EXTRACCIÓN DE CAROTENOIDES A PARTIR DE MICROALGAS

THEORETICAL ASPECTS OF THE EXTRACTION OF CAROTENOIDS FROM MICROALGAE

Diego Rubio Fernández*
Natalia Andrea Barrera Flórez**
Laura Angélica Fonseca Buitrago***
Carlos Eduardo Jaimes Baquero****

Recibido: 15 de agosto de 2017

Aceptado: 4 de octubre de 2017

Resumen

De las microalgas se extraen diferentes compuestos de interés científico y comercial; entre estos compuestos se encuentran los carotenoides. La extracción de carotenoides se ha incrementado por sus propiedades antioxidantes y su uso en dietas, colorantes naturales y productos farmacéuticos. Este artículo de revisión estudia tres fases del proceso de extracción para la obtención de carotenoides a partir de microalgas: selección de la microalga, cultivo de la cepa en diferentes condiciones para inducir la generación del compuesto y separación del metabolito que se encuentra en la biomasa de forma intracelular.

Palabras clave: biomasa, carotenoides, extracción, microalgas.

Abstract

From the microalgae different compounds of scientific and commercial interest are extracted; among these compounds are carotenoids. The extraction of carotenoids has been increased by its antioxidant properties and its use in diets, natural dyes and pharmaceuticals. This review article studies three phases of the process of carotenoid extraction from microalgae: microalgae selection, strain culture in various conditions to induce the generation of the compound and separation of the metabolite that is found in the biomass intracellular form.

Keywords: biomass, carotenoids, extraction, microalgae.

* Docente investigador. Grupo de investigación en Biotecnología, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. diego.rubio@profesores.uamerica.edu.co

** Estudiante del programa de Ingeniería Química. Grupo de investigación en Biotecnología, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. natalia.barrera@estudiantes.uamerica.edu.co

*** Estudiante del programa de Ingeniería Química. Grupo de investigación en Biotecnología, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. laura.fonseca2@estudiantes.uamerica.edu.co

**** Estudiante del programa de Ingeniería Química. Grupo de investigación en Biotecnología, Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia. carlos.jaimes@estudiantes.uamerica.edu.co

INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones biotecnológicas derivadas de los cultivos microalgales han generado un creciente interés, debido a la demanda de materias primas que pueden ser usadas en distintas áreas, como los biocombustibles (bioetanol o biodiesel), los nutraceuticos (aditivos, suplementos vitamínicos o productos alimenticios y cosméticos) y las sustancias de interés farmacéutico (Fernández-Linares, Montiel-Montoya, Millán-Oropeza y Badillo-Corona, 2012).

Entre las sustancias de alto valor agregado generadas a partir de microalgas se encuentran los carotenoides. Los carotenoides son los principales pigmentos que dan la mayoría de los colores amarillos, anaranjados o rojos de los alimentos vegetales y animales, como el β -caroteno, presente en las zanahorias; la β -criptoxantina, en las naranjas, y la luteína, en la yema de los huevos (Mendez Martinez, Vicario y Heredia, 2004). Los carotenoides representan compuestos antioxidantes beneficiosos para la prevención de diversas enfermedades, como el cáncer y los trastornos oculares, cardíacos y vasculares; también ayudan a mejorar el sistema inmunológico gracias a sus propiedades antioxidantes y hepatoprotectoras y efectos antibacterianos.

El proceso de producción de carotenoides a partir de microalgas tiene tres fases: selección de cepas, producción del metabolito y extracción del metabolito. Dado que el conocimiento del proceso es fundamental para generar aproximaciones de tipo experimental, el presente artículo resalta las principales características de las diferentes fases del proceso para definir los aspectos críticos de cada etapa y especificar sus ventajas y desventajas.

METODOLOGÍA

Se seleccionaron como fuente de información artículos de revistas indexadas, principalmente en Q3, Q2 y Q1. La información se ordenó y categorizó de acuerdo con la fase del proceso para el cual se estudió el artículo y la información se ordenó según los aspectos más relevantes que se buscó resaltar.

RESULTADOS

Definición

“Los carotenoides son pigmentos liposolubles naturales sintetizados por plantas, algas y bacterias fotosintéticas” (Zapata, Soriano, Márquez, López y González, 2015). Se extraen de microalgas porque estos organismos unicelulares son capaces de llevar a cabo procesos de fotosíntesis y se presentan como productores primarios en ecosistemas acuáticos. Son considerados fuente de alimento y sirven para el tratamiento de enfermedades (Guedes, Amaro y Malcata, 2011).

La estructura de estos pigmentos está formada por cadenas poliénicas, es decir, un extenso sistema de dobles enlaces conjugados. Los carotenoides que presentan en su estructura átomos de oxígeno se conocen como xantofilas; mientras que el grupo restante lo constituyen los carotenos (Sánchez et ál., 1991).

Obtención de carotenoides a partir de microalgas

El proceso de obtención de carotenoides por medio de bioprocesos ha llamado la atención en años recientes. El uso comercial de estos pigmentos naturales fue impulsado, entre otros factores, por las regulaciones cada vez más restrictivas sobre el uso de aditivos sintéticos en la industria alimenticia y la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades anticancerígenas. Aunque los carotenoides están presentes de forma natural en frutas, granos y vegetales, los diferentes procesos de producción masiva de microalgas tienen el potencial de mejorar estos procesos; sin embargo, los

costos de producción aún son elevados (en términos, por ejemplo, de los balances energéticos) y los rendimientos todavía son relativamente bajos.

Las diferentes partes del proceso para la obtención de carotenoides a partir de microalgas se encuentran resumidas en la figura 1.

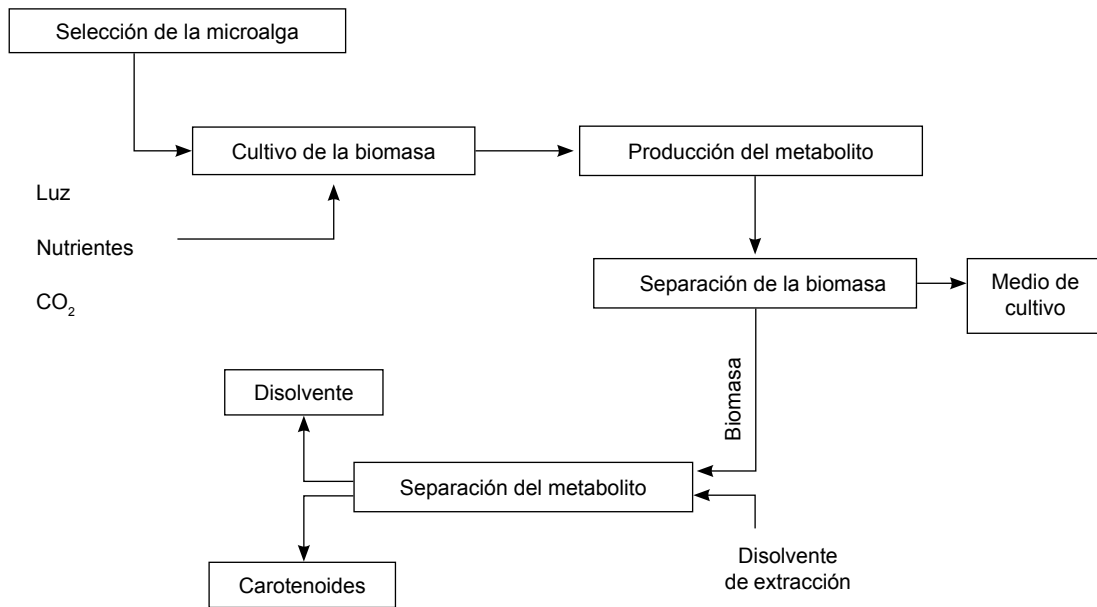


Figura 1. Diagrama del proceso.

Selección de especies de microalgas para la producción de carotenoides

Las diferentes especies de microalgas se adaptan a las condiciones de estrés que son estipuladas según el metabolito que se quiere obtener; esto ha permitido inducir la producción de carotenoides en niveles cada vez más altos, en otras palabras, la variación en las condiciones del cultivo microalgal, desde ideales hasta poco favorables, induce la producción de metabolitos.

Dentro de las microalgas más utilizadas para la producción comercial de carotenoides se encuentran las algas verdes (ver tabla 1). Estas algas se caracterizan por soportar diferentes condiciones de estrés, es decir, condiciones que presentan una variación en cuanto a los requerimientos óptimos de intensidad lumínica, pH o temperatura.

Tabla 1. Algunos carotenoides producidos a nivel industrial

| Especie de microalga | Tipo de carotenoide | Usos o aplicaciones | Tipo de microalga | Referencia |
|--|--|--|----------------------------------|---|
| <i>Dunaliella salina</i> | β -caroteno. | Se conoce por su actividad antioxidante y es usada en cosméticos y en suplementos nutricionales. | Microalga halófila (color verde) | Sánchez et ál. (1991) |
| <i>Haemato coccus pluvialis</i> | Astaxantina, cantaxantina, luteína | Antioxidante y fotoprotector. Se emplea en acuicultura para pigmentación en peces y ayuda al crecimiento del salmón y la trucha. | Microalga verde de agua dulce | Martínez (2003) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Cantaxantina, astaxantina, luteína | Complemento dietético. Se emplea como combustible y colorante de alimentos naturales. | Microalga de color verde | Cha, Koo y Lee (2008) |
| <i>Coelastrella striolata</i> var. <i>multistriata</i> | Cantaxantina, astaxantina, β -caroteno | Evaluación de la contaminación de agua; es posible estimar espectrofotométricamente el contenido de nitrógeno en ésta. | Microalga de color verde | Cha, Koo y Lee (2008) |
| <i>Scenedesmus almeriensis</i> | Luteína, β -caroteno | Aditivos alimenticios, sector cosmético, además de emplearse en el sector energético y farmacéutico. | Microalga de color verde | Plaza, Herrero, Cifuentes e Ibañez (2009) |
| <i>Chlorella ellipsoidea</i> | Violaxantina, anteraxantina, zeaxantina | Superalimento y suplemento dietético. Se le atribuye propiedades como controlar el peso, prevenir el cáncer e incrementar las defensas del sistema inmunológico. | Microalga de color verde | Sánchez et ál. (1991) |
| <i>Spirulina platensis</i> | β -caroteno, β -criptoxantina, astaxantina, zeaxantina, equinenona | Se usa como suplemento dietético, contiene proteínas, glúcidos, lípidos, ácidos nucleicos, vitaminas y algunos minerales. | Microalga de color verde azul | Martínez (2003) |
| <i>Chlorella zofingensis</i> | Luteína | Productor de astaxantina con aplicaciones en alimentos, piensos, nutraceuticos y la industria farmacéutica. | Microalga de color verde | Torrentera y Tacon (1989) |

Producción del metabolito

Factores que afectan el crecimiento microalgal

La Luz. Las microalgas son fotoautótrofas, es decir, convierten la luz en energía metabólica, y sus periodos de exposición luminosa pueden ser continuos o discontinuos (Barragán, Álvarez y Hernández, 2011).

De acuerdo a lo estipulado en Sierra, Fonseca, Sandoval y Rubio (2012):

La luz como recurso para las microalgas según Carvahlo, (2006) puede ser dividida en dos partes principales; la intensidad lumínica, que se define como la concentración de luz que afecta un volumen determinado de medio de cultivo dentro del fotobiorreactor y la longitud de onda que describe el color de luz utilizada para el cultivo. Un diseño óptimo debe maximizar la cantidad de luz transmitida

al cultivo, evitando el exceso por fotoinhibición. Por esto, la regulación lumínica en el fotobiorreactor se rige por la relación superficie (área)-volumen, que en el caso de los fotobiorreactores tubulares que son los más empleados, está determinada por los diámetros del fotobiorreactor. (p. 3)

De esta forma se establece, en general, que para un buen crecimiento y división celular a 20 °C la iluminación debe estar entre 2000-4000 lux (Torrentera y Tacon, 1989). La producción y acumulación de los carotenoides es afectada positivamente por la irradiación del espectro de la luz visible en las microalgas. Por otro lado, en cuanto a la longitud de onda adecuada para la producción de carotenoides, se ha definido que para la producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* (Elena, Kurmen, Gonz y Klotz, 2013) es necesario una combinación de luz ultravioleta y azul. Se considera que este es el mejor tratamiento para aumentar el contenido total de carotenoides y clorofila, ya que el contenido de carotenoides totales se incrementó alrededor de ocho veces y el contenido total de clorofila aumentó alrededor de dos veces con respecto al control efectuado, lo cual representa 5.1 mg/L y 6.55 mg/L, respectivamente. Mientras tanto, la combinación de luz ultravioleta con longitudes de onda roja aumentó la biomasa hasta células/ml.

Temperatura. Para las microalgas la temperatura óptima se encuentra entre 15 °C y 20 °C, aunque algunas pueden soportar temperaturas mayores (Torrentera y Tacon, 1989). Las variaciones en la temperatura afectan ampliamente la composición y respiración celular, así como a los ciclos de fotosíntesis, de los cuales dependen las reacciones enzimáticas y biológicas del proceso. Por lo tanto, en altas temperaturas de crecimiento la división celular se ve alterada, pero no la síntesis de proteínas, lo que aumenta la producción de carotenoides. Por su parte, a bajos niveles de temperatura se disminuye la tasa de absorción de nutrientes (Torrentera y Tacon, 1989).

Niveles de aireación. Es necesario homogeneizar el cultivo para evitar la sedimentación de las microalgas, mantener aireado el recipiente donde están contenidos y controlar la cantidad correcta de cada uno de los nutrientes. La aireación se considera un factor de alta importancia que debe ser tenido en cuenta para la biosíntesis de los carotenoides y el caudal de aire; igualmente, este factor es esencial para asimilar el sustrato y se considera necesario para la tasa de crecimiento, la masa molecular y la síntesis de carotenoides (Jawiarczyk y Fernández-Sevilla, 2012).

Rango de pH. “La respuesta de las microalgas al pH varía ampliamente debido a que este factor determina la solubilidad del dióxido de carbono y de los minerales en los cultivos” (Moronta, Mora y Morales, 2006). El CO₂ puede ser empleado para controlar el pH, ya que añadiendo CO₂ se acidifica el medio de cultivo, mientras que el consumo de nitratos por parte de las microalgas causa alcalización del medio. Para la obtención de carotenoides se debe mantener un pH entre 8.7 a 9 (Sánchez et ál., 1991). Por ejemplo, para la microalga *Chlorella pyrenoidosa* se emplearon variaciones de pH entre 4.5 y 8.5 de los cultivos y se concluyó que el pH de 6.5 favoreció la cantidad de carotenoides producidos en comparación con otros niveles de pH evaluados (Camacho, Martínez y Sánchez, 1988).

Salinidad. El factor de salinidad tiene como tendencia de crecimiento la disminución de los procesos metabólicos y la replicación celular. Sin embargo, como todas las especies no se comportan de la misma forma, es necesario determinar la cinética y tasas de crecimiento. Existe una correlación inversa entre la salinidad y la densidad celular, motivo por el cual, por medio de los cálculos necesarios, es indispensable saber la cantidad exacta de sal que se utilizará, generalmente cloruro de sodio (NaCl) mayor al 0.8 % de concentración (Suh, Joo y Lee, 2006).

Tabla 2. Condiciones de estrés para producción de carotenoides

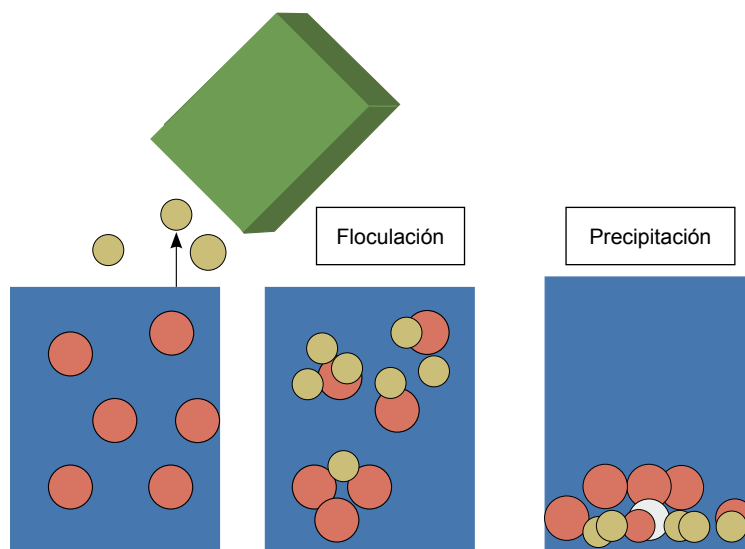
| Condición | Valor | Referencias |
|-------------------------|--|---------------------------------|
| Temperatura | 26 ± 1 °C. | Alma (2003) |
| Luz | 116 ± 8 μmoles/m ² seg – 430 μmoles/m ² seg. | |
| Salinidad | Alta concentración de cloruro de sodio (más de 0.8 %). | Aburai, Sumida y Katsuya (2015) |
| pH | 8.7 a 9. | López-Eliás et ál. (2013) |
| Limitación de nitrógeno | Nitratos: 18.75 g/L | |

El rendimiento del proceso depende de las concentraciones de nutrientes y del número de células microalgales; por ejemplo, en el caso de *Dunaliella salina*, “la acumulación de carotenoides depende de alta salinidad, altas temperaturas y alta intensidad lumínica. Dicha acumulación también se aumenta bajo condiciones de limitación de nitrato” (Díaz y Ordoñez, 2006).

Las condiciones de estrés anteriormente mencionadas también se aplican en el caso de la microalga *H. pluvialis* para la obtención de astaxantina; aquí, el cambio morfológico de células vegetativas verdes, para incrementar el número de células a células con quistes rojos que acumulan astaxantina, es inducido por algunos factores como temperatura alta, deficiencia de nutrientes (nitrato, magnesio, sulfato y fosfato), alta intensidad de luz, alta salinidad y estrés oxidativo (Elena et ál., 2013).

Separación de biomasa

Floculación. En este método se utiliza un agente floculante, como una sal inorgánica, con el que se busca que la biomasa sedimente en un menor tiempo (Vargas, 2004). El proceso de floculación se ve influido por diferentes aspectos tales como son: la naturaleza células, composición iónica y su concentración (ver figura 2). Actualmente este método es utilizado en *Spirulina*, debido a su capacidad floculante, y en *Phormidium bohneri*, por su capacidad de producir agregados multicelulares (Ruiz, 2011).

**Figura 2.** Floculación en los procesos de refinación de azúcar.

Fuente: elaboración propia basada en Biotecnología (2012).

Filtración en profundidad. En este tipo de filtración se cuenta una matriz filamentosa (se puede usar lana o un papel de filtro), y se da la separación debido a que las partículas más grandes quedan atrapadas en la matriz haciendo que el material restante por acción de gravedad pase a fondos del filtro y el producto deseado en la superficie (Oliva, 2009).

Centrifugación. Una centrifuga es básicamente un tanque de sedimentación en el que se aumenta la fuerza gravitacional para incrementar la tasa de sedimentación (Freifelder, 2003). La separación de la biomasa de su medio de cultivo se da gracias a la diferencia de densidades que hay entre estos (ver figura 3) (Monthieu, 2010).

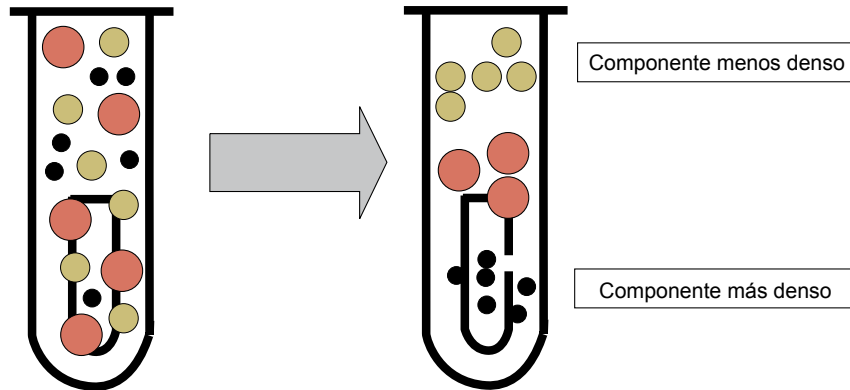


Figura 3. Proceso de centrifugación. Nota: el componente más denso queda en fondo del tubo. Se efectúa sedimentación en un campo de alta aceleración.

Fuente: elaboración propia basada en Biomodel (s.f., sec. 3).

Microfiltración. Es un proceso que se rige por el uso de membranas y permite concentrar un líquido, reteniendo los componentes que son más grandes que el diámetro del poro de la membrana, y permitiendo el paso de los componentes que son más pequeños (ver figura 4). Este mecanismo de separación es utilizado principalmente en microalgas de gran tamaño, como *Coelastrum* y *Spirulina* (Palomino, Estrada y Lopez, 2010).

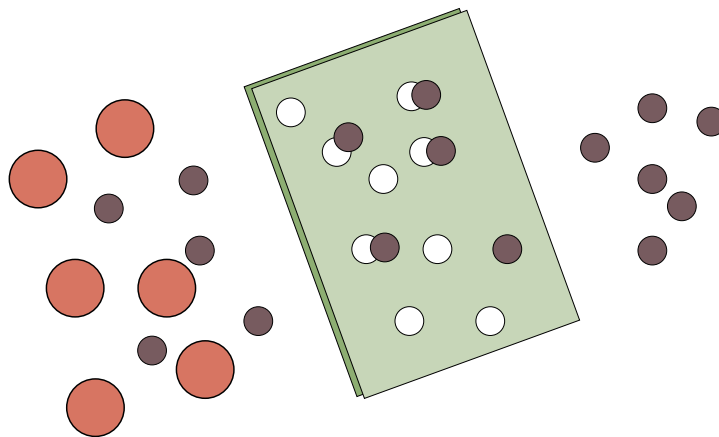


Figura 4. Proceso de microfiltración. Nota. Las partículas de menor tamaño atraviesan la membrana.

Fuente: elaboración propia basada en Biotecnología (2012).

Para tener una idea más amplia del método más efectivo y eficiente que se debe emplear, en la tabla 3 podemos observar las ventajas y desventajas que presentan los distintos métodos implementados en la industria para la obtención de la biomasa.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de los métodos de separación de la biomasa

| Método | Ventajas | Desventajas | Referencias |
|---------------------------|--|---|------------------|
| Floculación | Es un método convencional y fácil de realizar. | Puede producir toxicidad y es difícil de realizar en un escalamiento. | Salazar (2012) |
| Filtración en profundidad | Es un método sencillo, eficiente y barato. | Lento y con mano de obra intensiva. | Fernández (s.f.) |
| Centrifugación | La eficacia de esta técnica puede llegar al 95 %, las facilidades de limpieza de las centrífugas y la disponibilidad de máquinas esterilizables. | Altos costos. | Biología (2012) |
| Microfiltración | Se elimina la turbidez, puede tratar altos volúmenes de biomasa y no consume mucha energía. | Genera entre un 30 y 60 % de rechazo, no es muy eficiente y es costoso. | Aquara (s.f.) |

De los distintos métodos que se pueden encontrar en la industria para separar la biomasa, el más implementado es la centrifugación. Aunque este método presenta costos elevados por el uso de la centrífuga, tiene un alto nivel de eficiencia que permite recuperar rápidamente lo invertido. Además, es ideal para altos volúmenes de biomasa y no requiere una gran demanda energética.

Métodos de separación del metabolito

En los procesos metabólicos de las microalgas, el metabolito se encuentra en la biomasa de forma intracelular; por lo tanto, se implementan métodos de separación y purificación para obtener el producto de interés.

Aunque cada esquema de recuperación de producto deseado sea diferente, este sigue una secuencia general de etapas basadas principalmente en extracción, saponificación y separación.

La extracción o aislamiento. Consiste en “remover los carotenoides hidrofóbicos del medio hidrofílico” (Yeverino, 1997, p. 14). Durante este paso se eliminan los componentes cuyas propiedades difieren considerablemente del metabolito y requiere de una extracción líquido-líquido, en la que se obtienen mejores resultados en cuanto al nivel de pureza y rendimiento (Doran, 1995).

Para realizar la extracción de carotenoides se utilizan diversas técnicas. La más común es la extracción con solventes, aunque actualmente se está utilizando la extracción con fluidos supercríticos por sus ventajas en cuanto a pureza del metabolito, pero con desventajas como el alto costo del proceso y del equipamiento utilizado.

La extracción líquido-líquido, como método de separación de los carotenoides de la biomasa microalgal, se fundamenta en la separación de los productos en una disolución por distribución entre dos fases líquidas inmiscibles.

El componente líquido principal en la biomasa que entra a la etapa de extracción se conoce como disolvente portador; los componentes presentes en la solución se denominan solutos (estos contienen el metabolito). El disolvente de extracción es el líquido inmiscible que se adiciona con el propósito de que extraiga uno o varios solutos del disolvente portador en la mezcla (Perry, 2001). Existen, por lo tanto, ciertos criterios que deben ser evaluados en el momento de seleccionar el

disolvente adecuado para la extracción de los carotenoides. En la figura 5 se presentan los distintos aspectos que se deben tener en cuenta en la selección del disolvente para obtener una extracción o aislamiento exitoso.

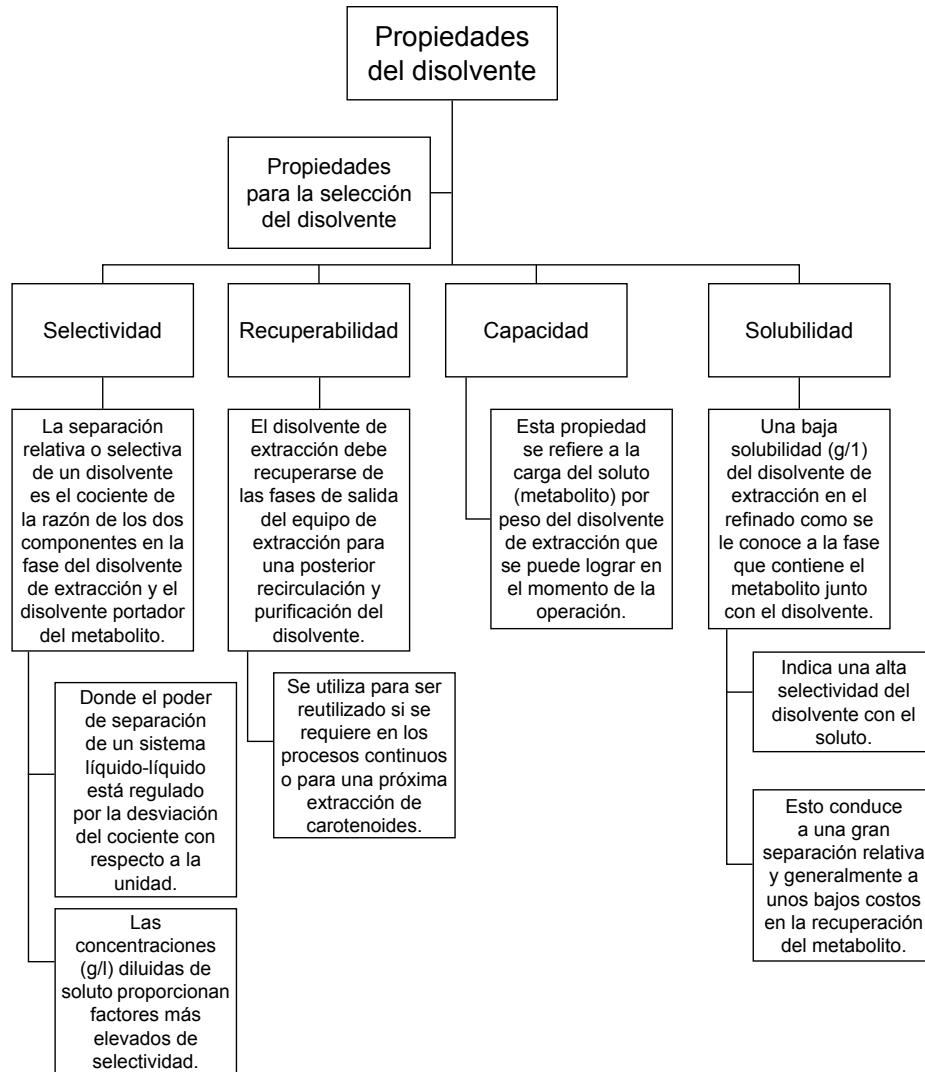


Figura 5. Selección del disolvente.

Los disolventes más empleados en la extracción de carotenoides son hexano (C_6H_{14}) y ciclohexano (C_6H_{12}); para otras extracciones líquido-líquido, como la extracción con soxhlet, se emplean acetona (C_3H_6O), etanol (C_2H_6O) y acetato de etilo de grado comercial ($C_4H_8O_2$) (Perry, 2001).

Fluidos en condiciones supercríticas, particularmente, el CO_2 en condiciones de alta presión, actúan como solventes selectivos con capacidad para extraer astaxantina (Zamudio, Cabanillas y Cristerna, 2003). La acetona que se emplea como solvente en el método soxhlet también es usada para la extracción de este carotenoide (Córdoba, Acero, Duque, Jiménez y Serna, 2015).

Diferentes solventes polares se pueden emplear para extraer Luteína. Entre estos encontramos, por ejemplo, el etanol. En distintos estudios de cromatografía de capa fina que se usan para

evaluar la eficiencia del etanol en la extracción de luteína se encuentra que usando este solvente se manifiesta mayor número de clorofilas en las extracciones.

Por su parte, solventes apolares, como el hexano, sirven para extraer carotenoides, como licopeno y zeaxantina.

Sin embargo, es aconsejable emplear técnicas de extracción que reduzcan la necesidad de emplear una etapa de saponificación posterior, debido a que esto puede causar degradación del producto de interés. Por esta razón se emplean también técnicas de extracción como la explicada por Bureau y Bushway (1986), que consiste básicamente en utilizar THF (tetrahidrofurano) estabilizado con BHT (butilhidroxitolueno) como solvente para extraer carotenoides (Yeverino, 1997); esta técnica tiene la ventaja de que no requiere una saponificación como paso seguido a la extracción con solventes.

Saponificación. El método más empleado para esta etapa es la saponificación Gross. Este procedimiento de purificación se usa para remover clorofilas y lípidos indeseables e hidrolizar hidroxicarotenoides esterificados con ácidos grasos (lo que libera los carotenoides). El método usa como solvente cloroformo-triton X-100 (Yeverino, 1997). El proceso de saponificación puede realizarse al disolver la mezcla con los carotenoides en metanol o etanol y adicionar hidróxido de potasio, al igual que agua y éter etílico (Lock, 1997).

Separación. Se basa principalmente en mezclar el contenido de la saponificación con éter etílico para terminar de extraer el resto de los carotenoides. Esto se hace para que los carotenoides no saponificados se terminen de disolver en el éter. Finalmente se realiza un secado a vacío.

Una vez los carotenoides han sido extraídos y separados completamente, se pasa a la cuantificación y detección de los mismos con el uso de detectores espectrofotométricos (Chasquibol, López, Cárdenas y Rodríguez, 2006); estos instrumentos son empleados en el análisis químico de muestras para cuantificación de sustancias en función de longitudes de onda. Debido a que los carotenoides son “compuestos coloreados con una alta proporción de dobles enlaces conjugados” (Yeverino, 1997, p. 16), se emplean detectores UV/Vis con arreglo de diodos porque son muy potentes y “permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. Cada carotenoide es caracterizado por su espectro de absorción [...], en donde generalmente aparecen 3 bandas que están en función del número de dobles enlaces” (p. 16) (ver tabla 4).

Tabla 4. Máxima absorbancia de carotenoides comunes

| Carotenoide | Λ | λ |
|--------------------|-----------|-----------|
| α -caroteno | 423 | 444 |
| β -caroteno | 425 | 450 |
| licopeno | 447 | 472 |
| zeaxantina | 427 | 451 |

Fuente: Yeverino (1997).

DISCUSIÓN

La búsqueda de nuevas soluciones para el control de diversas enfermedades, como el cáncer, trastornos oculares y déficit alimenticio, ha llevado al análisis de nuevas alternativas para la obtención de productos con mayores beneficios para la salud humana y el medio ambiente. El incremento de estudios sobre biomasa microalgal ha permitido llegar a grandes compuestos de interés, como los carotenoides. Sin embargo, los métodos de producción empleados actualmente para obtener estos pigmentos a partir de cultivos microalgales no han sido implementados en algunos países

como Colombia, debido, por una parte, a los costos de operación que implica el empleo de diferentes fotobiorreactores que ayudan a obtener una mayor eficiencia en el proceso y, por otra, a la falta de investigación en el tema. Los carotenoides son una nueva alternativa para la disminución de la contaminación producida por las industrias y el descubrimiento de nuevos compuestos para la salud humana.

CONCLUSIONES

La aplicación de condiciones de estrés a los cultivos de microalgas es un paso fundamental para inducir la acumulación de carotenoides en las células microalgales; sin embargo, estas condiciones no son compatibles con la búsqueda de una alta productividad de células, lo que genera dificultades para la obtención de buenos rendimientos del proceso.

De los pasos o fases del proceso de obtención de carotenoides a partir de biomasa microalgal, la separación del metabolito a partir de disolventes químicos continúa siendo crítica, dada la necesidad de utilizar sustancias altamente contaminantes; en este sentido, la búsqueda de nuevos métodos y sustancias para la separación debe ser una de las prioridades de la investigación en este campo.

REFERENCIAS

- Aburai, N., Sumida, D., y Katsuya, A. (2015). Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, 8, 30-36.
- Acacio, N., Almera, J. Araujo, J. Barreno, D., Betancourt, R., y Colina, R., y Zumalacárregui, L. (2013) Desarrollo de un procedimiento para la extracción de β -caroteno y glicerol a partir de la microalga *Dunaliella* sp. en la salina Las Cumaragua. *Revista Cubana de Química*, XXV(2), 214-228.
- Alma, D. (2011). *Comparación de la producción de pigmentos carotenoides por Haematococcus pluvialis y Phaffia rhodozyma*. España: Editorial Académica Española.
- Aquara. (s.f.). *Microfiltración*. Recuperado el 28 de Octubre octubre de 2015, de <http://aquara.com.pe/productos/microfiltracion>
- Barragán, B., Álvarez, L., y Hernández, M. (2011). Producción biotecnológica y aplicación en celdas solares de los carotenoides. *Sistemas Ambientales*, 4(1), 10-20.
- Biotecnología. (14 de Junio junio de 2012). *Unidad 4. Producción de biomasa microbiana*. Recuperado el 28 de Octubre de 2015, de <http://biotec8.blogspot.com.co/2012/06/unidad-4-produccion-de-biomasa.html>
- Biomodel. (s. f.). *Centrifugación*. Recuperado el 28 de Octubre de 2015, de <http://biomodel.uah.es/tecnicas/centrif/inicio.htm>
- Bureau, J., y Bushway, R. (1986). HPLC Determination of Carotenoids in Fruits and Vegetables in the United States. *Journal of Food Science*, 51(1), 128-130.
- Camacho, F., Martínez, M., y Sánchez, S. (1988). Influencia pH en el crecimiento Heterotrófico de la *Chrorella pyrenoidosa*. *Afinidad*, 411, 395-399.
- Córdoba, N., Acero, N., Duque, L., Jiménez, L., y Serna, J. (2015) Obtención y caracterización de astaxantina de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *UGCiencia*, 21, 73-82.

- Cha, K., Koo, S., y Lee, D. (2008). Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella Ellipsoidea* and *Chlorella Vulgaris* on human colon cancer cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10521-10526.
- Chasquibol, N., López, J., Cárdenas, R., y Rodríguez, M. (2006). Estudio y cuantificación de carotenoides por métodos espectroscópicos del fruto del níspero de la sierra y su valoración como alimento funcional. *Revista peruana de química e ingeniería química*, 9(1), 3-9.
- Díaz, V., y Ordoñez, C. (2006). *Evaluación del pH y la agitación del medio más adecuada para el crecimiento de Dunaliella Salina en condiciones de laboratorio*. Bogotá D. C.: Pontificia Universidad Javeriana.
- Doran, P. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*. Londres: Academic Press.
- Elena, J., Kurmen, C., Gonz, G., y Klotz, B. (2013). Producción de Astaxantina en Haematococcus pluvialis bajo diferentes condiciones de estrés 1. *Noova*, 11(19), 94-104.
- Fernández-Linares, L., Montiel-Montoya, J., Millán-Oropeza, A., y Badillo-Corona, J. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai*, 8(3), 101-115.
- Fernández, M. (s. f.). *Filtración* [PDF recuperado de página web de la Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla]. Recuperado el 28 de octubre de 2015, de http://personal.us.es/mfarevalo/recursos/tec_far/filtracion.pdf
- Freifelder, D. (2003). *Técnicas de bioquímica y biología molecular*. San Francisco: Reverté.
- Fundación Chile. (2014). *Tecnologías de membrana*. Santiago de Chile: Fundación Chile.
- Guedes, A., Amaro, H., y Malcata, F. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, 9(12), 625-644. <http://doi.org/10.3390/md9040625>
- Harvard Forest. (s. f.). *Leaf Pigments*. Recuperado de <http://harvardforest.fas.harvard.edu/leaves/pigment>
- Jawiarczyk, N., y Fernández-Sevilla, J. (2012). Valorización de biomasa de microalgas : Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. *Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental y Algal*, 3(2), 147-161.
- Lock, O. (1997). *Colorantes naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica de Perú.
- López-Elías, J., Fimbres-Olivarría, D., Medina-Juárez, L., Miranda-Baeza, A., Martínez-Córdova, L., y Molina-Quijada, D. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de Dunaliella tertiolecta en medios limitados. *Revista internacional de botánica experimental*. *Phyton*, 82, 23-30.
- Martínez, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróticamente* (tesis de maestría). Máster Universitario en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Melendez Martinez, A., Vicario, I., y Heredia, F. (2004). *Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos*. Scielo, 209-215.
- Monthieu, C. (2010). *Estudio técnico económico de la extracción de los lípidos de las microalgas para la producción de biodiesel* (tesis de pregrado). Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad Pontificia Comillas, Madrid, España.

- Moronta, R., Mora, R., y Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Economía*, 23(1), 28-43.
- Oliva, M. (2009). *Filtración*. Barcelona: México.
- Palomino, A., Estrada, C., y Lopez, C. (2010). Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. En *IV Congreso Brasileiro de Mamona E y I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas*. Congreso llevado a cabo en João Pessoa, Brasil.
- Perry, R. (Ed.). (2001). *Manual del ingeniero químico*. México: McGraw-Hill.
- Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., e Ibañez, E. (2009). Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(16), 7159-7170.
- Química Experimental ITSM. (2013). *Práctica 4: Técnicas experimentales básicas en el laboratorio de química: extracción, sublimación y cristalización*. Monterrey: Tecnológico de Monterrey. Recuperado de <http://quimica-experimental-itism.webnode.mx/news/practica-4-tecnicas-experimentales-basicas-en-el-laboratorio-de-quimica-extraccion-sublimacion-y-cristalizacion-/>
- Romero, L., Guevara, M., D'Armas, H. y Lodeiros, C. (2008). Cuantificación de carotenoides totales y β -caroteno en dos cepas de *Dunaliella salina* (chlorophyta, volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, 47(1), 67-76.
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente* (tesis de maestría). Maestría en Ingeniería Hidráulica y Medio Ambiente, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Salazar, L. (2012). *Teoría de la floculación. Diseño de plantas potabilizadoras*. Bogotá: Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Recuperado el 28 de octubre de 2015, de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358040/Contenido_en_linea_Disenio_de_Plantas_Potabilizadoras/leccin_31_teora_de_la_floculacin.html
- Sanchez, L., y Martinez, A. (2012). Producción de biocombustibles a partir de microalgas. *Ra Ximhai: Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable*. México: Universidad Autónoma Indígena de México.
- Sánchez, L., Flores-Cotera, L., Langley, E., Martin, R., Maldonado, G., y Sánchez, S. (1991). Carotenoides: estructura, función, biosíntesis y regulación. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41(3), 175-192.
- Sierra, J. A., Fonseca, S., Sandoval, J., y Rubio, D. (2012). Diseño de un fotobiorreactor *airlift* a escala banco. *Elementos*, 4(4), 123-143.
- Suh, I., Joo, H., y Lee, C. (2006). A novel double-layered photobioreactor for simultaneous *Haematococcus pluvialis* cell growth and astaxanthin accumulation. *Journal of Biotechnology*, 125(4), 540-546.
- Sun, Z., Cunningham, F., y Gantt, E. (1998). Differential expression of two isopentenyl pyrophosphate isomerases and enhanced carotenoid accumulation in a unicellular chlorophyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(19), 11482-11488.

- Torrentera, L., y Tacon, A. (1989). *La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/contents/36ec64d7-d6e7-52c3-8d43-dc199945d143/AB473S00.htm>
- Vargas, I. (2004). *Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: Teoría*. Lima: Organización Panamericana de la Salud.
- Yeverino, M.. (1997). *Determinación cuantitativa de carotenoides en hojas de cinco especies del género Leucaena* (tesis de maestría). Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo Lelón, Monterrey, México.
- Zamudio, B., Cabanillas, L., y Cristerna, J. (2003). *Optimización del proceso de extracción de astaxantina por medio de fluidos supercríticos de desechos de camarón*. Recuperado de http://sistema-nodalsinaloa.gob.mx/archivoscomprobatorios/_7_proyectosinvestigacion/13439.pdf
- Zapata, M., Soriano, E., Márquez, V., López, M., y González, A. (2015). *Jornadas internacionales de investigación en educación y salud*. Almería: UAL.