

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

I.1.- Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de la cadena trófica, que las constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica. Por su tamaño reducido y variado (5–50 μm en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton (Abalde, 2004).

Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados en laboratorio y nos ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo. Actualmente a nivel comercial, los cultivos masivos de microalgas al exterior y los fotobiorreactores cobran mayor importancia para la producción de compuestos químicos de alta pureza, como: biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así mismo, para el tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos terapéuticos y como alimento de consumo humano y animal (Contreras-Flores y col., 2003).

En condiciones normales todas las clases de microalgas poseen invariablemente la clorofila-*a* que confiere el color verde a las algas y al menos un pigmento accesorio, que puede enmascarar en ocasiones a la clorofila-*a*. La clorofila-*b* se encuentra en las plantas verdes, la clorofila *c* en diatomeas, dinoflagelados y algas pardas y la clorofila *d* en las algas rojas. Cultivadas bajo condiciones adecuadas de iluminación, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes, las microalgas representan una excelente fuente de pigmentos carotenoides. Diversos estudios han demostrado que la producción de carotenoides en microalgas, como *Dunaliella salina*, puede optimizarse mediante variaciones en las condiciones de cultivo tales como: altas salinidades; incremento en la irradiancia y en la temperatura (Ben-Amotz, 1987); ó estrés por limitación de nutrientes (Borowitzka y Borowitzka, 1988).

Las microalgas como organismos autótrofos fotosintetisadores, dependen de la luz para su desarrollo y producción de materia orgánica. La respuesta fotosintética a la energía luminosa se caracteriza por una respuesta lineal baja al incremento en la irradiancia, hasta llegar a su máxima capacidad fotosintética, donde las células son independientes de la irradiación (Abalde, 2004). Bajo condiciones estables (no movimiento) las células se aclimatan a un nivel de irradiancia, obteniendo bajo esas condiciones tasas de crecimiento y fotosintéticas no necesariamente óptimas mediante un ajuste en sus procesos fisiológicos. En células aclimatadas a bajas irradiancias, la concentración de clorofila se incrementa para poder obtener la energía luminosa necesaria para continuar con el proceso fotosintético. Por otro lado, células aclimatadas a altas irradiancia, decrece la concentración celular de clorofila-*a* e incrementan la concentración de pigmentos accesorios fotoprotectores (carotenos) para evitar la oxidación de los fotosistemas. MacIntyre y col., (2002), reportan que células aclimatadas a alta iluminación no mostraron una tasa de crecimiento mayor que células en baja iluminación, porque a saturación de luz, las concentraciones de clorofilas serán proporcionalmente mucho menores de la masa total de los pigmentos celulares en alta iluminación.

Se ha observado que la salinidad alta tiene influencia en la capacidad de la microalgas para adquirir los nutrientes necesarios para su crecimiento y productividad. Algunos autores han documentado una disminución en las densidades celulares finales cuando se aumenta la salinidad del medio de cultivo (Serpa-Ibáñez, 2006; Barbarena y Montoya, 1990; Ben Amotz y Avron, 1989; Borowitzka y Borowitzka 1988; y Cifuentes y col., 1992). Estas condiciones no favorecen la producción de clorofilas, y si la de pigmentos accesorios, ya que a limitación de nutrientes (nitrógeno) las clorofilas son precursoras de otros pigmentos, razón por la cual puede haber una producción de carotenos celulares bajo estas condiciones (Cullen y Eppley, 1981).

Entre los compuestos de más interés obtenidos de las microalgas, destacan los carotenoides, biodiesel, ficobiliproteínas, lípidos, polisacáridos, y compuestos con actividad biológica provenientes de las especies más utilizadas tales como *Dunaliella*, *Spirulina* y *Porphyridium*. (Abalde y col., 1995) además de *Chlorella*, y *Hematococcus*. Se han identificado más de 600 carotenoides producidos naturalmente en plantas, animales y hongos, de los cuales 400 han sido aislados y caracterizados; de éstos sólo un número reducido se

utiliza comercialmente destacando entre ellos el β -caroteno y la astaxantina y solo 50 poseen actividad provitamina A. Los carotenoides hidrocarbonados se denominan colectivamente como carotenos y aquellos que contienen oxígeno se denominan xantofilas (Ong & Choo, 1997; Rodríguez-Amaya, 1999; Che Man y Tan, 2003).

La mayoría de los carotenoides se obtienen mediante síntesis química. Solo dos microalgas unicelulares clorofíceas son fuentes comerciales reconocidas de carotenoides: la microalga flagelada *Dunaliella salina*, que acumula β -caroteno y el alga verde de agua dulce *Haematococcus pluvialis* que produce astaxantina. Existen además otras especies de microalgas y cianobacterias cultivadas comercialmente como son: *Chlorella*, *Spirulina*, *Dunaliella*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, *Skeletonema*, *Isochrysis* y *Chaetoceros* (Sánchez-Varo, 2000).

I.2.- Microalgas utilizadas en esta investigación

I.2.1. *Isochrysis* sp

Pertenece a la clase Haptophyceae, es una célula flagelada de color amarillo con dos flagelos móviles, sin pared celular, que tiene un tamaño de entre 6 y 8 micras. Es un alga que crece a temperaturas entre 16 y 35°C, salinidades entre 25 a 28 e iluminación intermedia (4000 lux). Esta especie es muy importante como alimento para las larvas de moluscos bivalvos y larvas de camarón (Fabregas y col., 1985). *Isochrysis*.aff *galbana* (clon T-ISO) constituyen especies de enorme interés dentro de la acuicultura, que por sus altos contenidos de ácidos grasos poli-insaturados, ácido ecosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) respectivamente, desempeñan un papel fundamental en el área de la alimentación larvaria. (Salas-Leiton y col., 2003) (Anexo 1. Figura i, ii).

I.2.2. *Tetraselmis* sp

Esta microalga pertenece a la clase Prasinophyceae. Es una célula comprimida elipsoidal que mide entre 10 y 16 micras de largo, de color verde brillante y posee 4 flagelos. Es un alga eurihalina que crece a temperaturas entre 18 y 30 °C, pH entre 7.5 y 8.0 y

salinidades de 25 a 40 e iluminación constante con fotoperiodo natural. Esta especie ha sido empleada regularmente como alimento para moluscos bivalvos (larvas, semillas y adultos), así como en los estadios larvarios de peces y crustáceos. *Tetraselmis* sp. muestra un alto potencial como probiótico (Irianto y Austin, 2002), y por su alto contenido de vitamina E ha sido propuesta como fuente de vitaminas para consumo humano y animal (Carballo-Cárdenas y col., 2003) (Anexo 1, figura iii y iv).

I.2.3. *Chaetoceros* sp.

Chaetoceros sp pertenece a la clase Bacillariophyceae, es una diatomea céntrica planctónica cosmopolita, son unicelulares y no forman cadenas, mide entre 6 - 8 micras en su eje apical, tiene 4 setas o espinas. Las condiciones de cultivo son: temperatura entre 16 y 40°C, salinidades entre 28 y 40, con iluminación constante y fotoperiodo natural. Esta especie es ampliamente utilizada como alimento en los primeros estadios larvarios de camarones peneidos y durante todo el ciclo de vida de moluscos bivalvos. (López-Elías y col., 2004). *Chaetoceros* sp presenta los niveles más altos de producción de carotenoides en cultivos batch, con alta iluminación ($400 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$) durante la etapa exponencial de su curva de crecimiento, siendo su mayor eficiencia de crecimiento relativo a $210 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ y la luz blanca la más eficiente para promover su crecimiento. La concentración de clorofila es más alta durante el crecimiento exponencial que en el estacionario y en todos los casos los carotenoides mantienen una tendencia inversa a las clorofilas. (Sánchez-Saavedra y Voltolina, 2002) (Anexo 1, Figura v y vi).

I.2.4. *Dunaliella* sp.

Pertenece a clase Chlorophyceae, es una célula verde-amarillo, posee 2 flagelos móviles, de forma ovoide con el extremo anterior agudo y el posterior redondo. Miden entre 9 y 11 micras de largo y 6 micras de diámetro. Es un alga eurihalina que crece a temperaturas de 16 a 28°C, aunque se adapta a salinidades altas e iluminación constante. *Dunaliella* tolera pH's de entre 5.5-10, siendo 7 el óptimo (López-Elías y col., 2004), sin embargo el pH óptimo para la producción de β -caroteno por *Dunaliella salina* es pH=9 y presenta una amplia tolerancia a la

temperatura, siendo la óptima entre 20 y 40° C. (Sánchez-Varo, 2002). Esta especie se considera como un alimento adecuado para moluscos, algunos peces de agua dulce y crustáceos, es la especie más utilizada en la producción industrial de β -caroteno.

Dunaliella salina se ha reportado como la mayor fuente natural de β -caroteno, posee la habilidad de acumular grandes cantidades de este tetraterpeno (10 al 14% de su masa seca) cuando se somete a condiciones de cultivo estresantes (Ben-Amotz y Avron, 1982), seguida por *Dunaliella parva* y *Dunaliella tertiolecta*, con 9% de su masa seca y *Dunaliella viridis*, con 7% de β -caroteno y carotenoides mixtos (Moulton y Burford, 1990) (Anexo 1, Figura vii y viii).

I.3.- Pigmentos Carotenoides

Los carotenoides son un grupo de pigmentos que le proporciona sus colores característicos a los vegetales, desempeñan su función principal en la fotosíntesis, dado que poseen capacidad para extinguir moléculas en estado tripe y regresarlas a su estado basal. Para extinguir la energía de excitación del oxígeno en estado simple (altamente destructivo) y regresarlas a su estado triple normal (el oxígeno es una molécula inusual dado que es más estable en estado triple que en estado simple), también presentan extinción de los centros de reacción de los fotosistemas cuando son sobreexcitados por la luz muy intensa. Con su capacidad antioxidante neutralizan o bloquean la recepción de radicales libres del oxígeno que puedan causar daño a las estructuras y funciones de la membrana celular y al ADN de las proteínas. (Ramos-Carrión, 2007; Capelli y Cysewski, 2007).

Los carotenos son componentes del metabolismo secundario de las plantas, tanto los carotenoides como la astaxantina son un producto de la vía mevalónica a través del acetato proveniente de la fotosíntesis y de la respiración, conocida también como vía de los terpenos. El ácido mevalónico da origen a un polímero isopentil difosfato de 5 carbonos (C5) formando: Geranildifosfato (C10) monoterpenos, esteroides y triterpenos (C30), el farnesildifosfato (C15), da origen a sesquiterpenos (C15) y escualeno; al Geranilgeranildifosfato (C20), diterpenos, fitoles y la clorofilas, así como al fitoeno, este por desaturación produce el Licopeno principal (pigmento del tomate y compuesto acíclico) que por una doble ciclización da origen al β -

caroteno (que da la coloración amarillo naranja a la zanahoria) y dos núcleos de β -ionona. La oxigenación de β -caroteno, confiere la coloración naranja de la cantaxantina, posteriormente la hidroxilación produce las xantofilas y diversos compuestos carotenoides: luteína, zeaxantina, equinenona, cantaxantina (originada de la oxigenación del β -caroteno) y finalmente astaxantina (anexo 1, Fig. i.) (Goodwin, 1980; Goodwin, 1984; Young y Britton, 1993; Margalith, 1999; Salas-González 2000).

Los carotenoides se encuentran como tetraterpenos en los pigmentos fotosintéticos o en complejos proteicos en plantas superiores y bacterias fototróficas, incluyendo cianobacterias. La función de la astaxantina en las microalgas es la fotoprotección del aparato fotosintético bajo diferentes condiciones de estrés (Borowitzka y col., 1991; Boussiba y Vonshak, 1991; Kobayashi y col., 1997) Se trata de un cetocarotenoide derivado del β -caroteno y que se caracteriza por poseer un grupo ceto (=O) y un grupo hidroxilo (-OH) en los extremos cíclicos de la molécula, que le confieren un gran poder reactivo, por lo que se clasifican dentro de las xantofilas mientras la luteína posee un grupo (-OH) que la ubica como un caroteno al igual que el β -caroteno (Higuere-Ciapara y col., 2006).

La producción de carotenoides a niveles masivos a partir del cultivo de microalgas se postuló en los años 50's, como una alternativa para obtener alimento para el hombre (Becker, 1994). En los años 60's y 70's se buscó desarrollar el rendimiento de biomasa en los cultivos de estos organismos. Con el transcurso de los años se diversificaron las áreas para las microalgas eucariotas (Vílchez y col., 1997) y cianobacterias (Morales y col., 2002; Prospero y col., 2000). El β -caroteno fue el primer carotenoide purificado en 1831 por Wackenroder quien lo aisló en forma cristalina partir de la zanahoria, dándole el nombre que lleva, derivado de la denominación latina de este vegetal (*Daucus carota*). También fue el primer carotenoide natural producido a nivel industrial a partir de microalgas. Otros de igual importancia son el licopeno, el cual confiere su color característico a los tomates, así como la luteína que se encuentra presente en todos los vegetales de hojas verdes (Chung y col., 2004).

Shpigel y col (2006) concluyen que el β -caroteno es un precursor de la echinenona en las gónadas del erizo *Paracentrotus lividus*, encontrando una correlación directa entre la concentración y la coloración comercialmente deseable de las gónadas (Fig. iii, Anexo 2). La astaxantina influye en la reproducción en animales: en salmónidos es movilizadada desde el

músculo a los ovarios antes de la puesta (Nakano y col., 1999; Bell y col., 2000), la carencia de este pigmento en la dieta de las larvas de peces puede llevar a problemas en el desarrollo larvario como sucede en las larvas de “halibut” o mejor conocido como “lenguado” produciéndose una producción anormal del ojo y una mala pigmentación (Ronnestad y col., 1998). La astaxantina es usada para la pigmentación de la piel y la carne de peces, sobre todo en salmónidos, aunque también en cultivo de crustáceos, dorada rodaballo y peces ornamentales (Lorenz y col., 2000). También se cree que la astaxantina es importante en la reproducción de estas especies (Higuera-Ciapara y col., 2006).

El licopeno, el β -caroteno, la luteína así como las xantofilas (astaxantina y cantaxantina) son los principales carotenoides de interés comercial. Al licopeno como a otros carotenoides, se le atribuyen no solo funciones antioxidantes sino también otras propiedades, como favorecer la disminución del colesterol en la sangre, prevenir la inflamación de próstata, reducir la posibilidad de padecer distintos tipos de cáncer, aterosclerosis e infartos cerebrales. (Torresani, 2009).

Se ha encontrado que la astaxantina es 550 veces más potente que la vitamina E y 11 veces más que el β -caroteno como antioxidante, la astaxantina protege del daño de los rayos de luz ultra violeta, previene la degeneración macular y pérdida de visión, lo mismo que la luteína. La astaxantina tiene un elevado potencial como antioxidante, inmunoregulador, anti-inflamatorio y agente anticarcinogénico, y en los últimos años el interés por este pigmento se ha ido incrementando a medida que nuevos estudios le confieren nuevas propiedades y no solo la capacidad de pigmentación (Guerin y col., 2003; Capelli y Cysewski 2007)

I.4.- Importancia comercial.

La demanda de carotenoides de origen natural ha crecido de manera continua desde la década de los 70's. Sanchez-Varo 2002 reportó que el precio aproximado para una presentación en polvo que contenga entre un 5 y un 10% de carotenoides activo era de 600 USD por Kg. para el β -caroteno, 900 USD para los apocarotenoides, 1300 USD para la cantaxantina y 2500 USD para la astaxantina. Que en ese momento eran los carotenoides más utilizados como suplementos alimenticios y en la industria de alimentos funcionales.

En el 2004 se estimó en 887 millones de dólares el valor total del mercado de todos los carotenoides comercialmente usados a nivel mundial, y con una tasa de aumento promedio anual del 2.2% aproximadamente (BCC Reseach 2004). Sin embargo el éxito más grande del mercado de carotenoides durante el año 2004 fue la luteína, cuando impuso un valor de mercado de \$139 millones de dólares en ese año (BCC Reseach 2004).

Se ha estimado que las ventas anuales de carotenoides sintéticos ascienden a 500 millones de dólares, y a pesar de que las estimaciones de crecimiento del mercado mundial de carotenoides no fue lo que se esperaba, para el 2007 alcanzó los \$ 766 millones de dólares. De esta forma se espera que aumente a \$ 919 millones de dólares para el 2015, a una tasa de crecimiento anual compuesto de 2.3%. El β -caroteno posee la mayor cuota de mercado con un valor de 247 millones en el 2007, y se espera que este segmento alcance un valor de 285 millones de dólares en 2015 (BCC Reseach 2007).

Se han establecido plantas de producción de β -caroteno utilizando la microalga *Dunaliella* sp. en Australia, Estados Unidos e Israel. En los cultivos se utilizan tanto sistemas extensivos como intensivos, las cifras conocidas colocan a Australia como el principal productor con 640 ha. y una producción entre 16-20 ton/año. Israel con 5 ha. 3-4 ton/año (Del Campo y col., 2007). Otras microalgas acumulan carotenoides de interés comercial, constituyendo fuentes potenciales de estos pigmentos que poseen un alto valor en el mercado.

Por lo anterior, la finalidad de esta investigación es explorar la capacidad de carotenogénesis de cuatro de los géneros de microalgas endémicas, utilizadas en la acuicultura de la región y evaluar su potencial de producción de estos pigmentos. Los cuales por sus propiedades como antioxidantes y por sus usos tanto en la alimentación animal como humana, poseen un alto interés científico y valor comercial añadidos.