

Revisión del estado actual de las formulaciones y aplicaciones de astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis*

Review of the Current Status of Formulations and Applications of Astaxanthin Produced by *Haematococcus Pluvialis*

Valeria Ariza Hernández^{ab}, Michel Camila Garzón Pulido^{ac}, Judith Elena Camacho Kurmen^{ad}

^a Grupo de Investigación Bioprocesos y Control, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Colombia

^b variza@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0001-5286-1011>

^c michelcgarzon@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0001-5950-4471>

^d jelenacamacho@unicolmayor.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-9588-9935>

Citation: Ariza Hernández, V., Garzón Pulido, M. C., y Camacho Kurmen, J. E. (2023). Revisión del estado actual de las formulaciones y aplicaciones de astaxantina producida por *Haematococcus pluvialis* *Mutis*, 13(1). 1-27.
<https://doi.org/10.21789/22561498.1894>

Recibido: 17 de marzo del 2022

Aceptado: 8 de junio del 2022

Copyright: © 2023 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESUMEN

La astaxantina es un pigmento carotenoide ampliamente reconocido por sus propiedades antioxidantes y por sus grandes beneficios sobre la salud. Aunque existen varios microorganismos que tienen la capacidad de sintetizar este carotenoide, la microalga *Haematococcus pluvialis* ha demostrado ser la fuente más promisoría al realizarlo bajo condiciones de estrés por deficiencia de nutrientes, diferentes intensidades de luz, entre otros. Dado que la astaxantina es una molécula con gran inestabilidad química, baja biodisponibilidad e hidrofobicidad, existen diferentes métodos de formulación, que mejoran su estabilidad y por ende su uso como colorante y compuesto bioactivo en productos alimenticios, nutracéuticos, cosméticos, acuícolas o farmacéuticos. Debido a las diferentes aplicaciones y utilidades del carotenoide, se propone como objetivo conocer las aplicaciones y formulaciones existentes de astaxantina como métodos para mejorar su estabilidad, biodisponibilidad y aplicación, e identificar los materiales utilizados y las tecnologías aplicadas en los procesos de formulación. Las emulsiones, liposomas, encapsulados y microencapsulados, representan las formulaciones actuales, las cuales utilizan como diferentes materiales para proteger la pared, y evitar la oxidación del carotenoide, alginato de calcio, aceite de girasol, aceite de soja, maltodextrina y goma arábiga, estos presentan diferentes porcentajes de eficiencia de encapsulación entre 40-98.8% (Burgos-Díaz et al., 2020, Oh et al., 2020), y se emplean tecnologías como emulsificación, liofilización, nanoliposomas, spray drying, entre otras.

Palabras clave: microalga; carotenoide; encapsulado; compuesto bioactivo; colorante; ciencias naturales.

ABSTRACT

Astaxanthin is a carotenoid pigment widely recognized for its antioxidant properties and its great health benefits. Although there are several microorganisms that have the ability to synthesize this carotenoid, the microalgae *Haematococcus pluvialis* has proven to be the most promising source since it performs the synthesis under stress conditions due to nutrient deficiency and different light intensities, among others. Because astaxanthin is a molecule with great chemical instability, low

bioavailability and hydrophobicity, there are different formulation methods that improve its stability and, therefore, its use as a colorant and bioactive compound in food, nutraceutical, cosmetic, aquaculture or pharmacist products. Due to the various uses of the carotenoid, the objective of this research is to know the existing applications and formulations of astaxanthin as methods to improve its stability, bioavailability and application, and to identify the materials used and the technologies applied in the formulation processes. Emulsions, liposomes, encapsulates and microencapsulates represent the current formulations, which use calcium alginate, sunflower oil, soybean oil, maltodextrin and gum Arabic as different materials –these present different percentages of encapsulation efficiency between 40-98.8%– to protect the wall, and prevent oxidation of the carotenoid (Burgos-Díaz et al., 2020, Oh et al., 2020), and technologies such as emulsification, lyophilization, nanoliposomes, spray drying, among others, are used.

Keywords: microalgae; carotenoid; encapsulated; bioactive compound; colorant; natural sciences.

INTRODUCCIÓN

Haematococcus pluvialis es una microalga unicelular de la familia *Haematococcaceae* y de la clase *Chlorophyceae*. Se encuentra ampliamente distribuida en cuerpos de agua dulce, y cuando se somete a condiciones ambientales extremas es la principal productora de uno de los antioxidantes más potentes de la naturaleza, astaxantina (Shah et al., 2016). Este carotenoide de color rojo brillante del tipo xantofila, liposoluble, perteneciente a los terpenos, es conocido también como 3,3'-dihidroxi- β -caroteno-4,4'-diona; y, además de aportar color a carnes como la del salmón o langostino, es un compuesto natural que presenta amplias aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética, acuícola, nutracéutica y farmacéutica (Khoo et al., 2019).

Este pigmento carotenoide posee varias funciones biológicas como la pigmentación, protección contra la luz ultravioleta (UV), respuesta inmune, tolerancia al estrés y protección contra la oxidación de macromoléculas (Davinelli et al., 2018). Debido a estas propiedades, es evidente que comparte ciertas características y se encuentra relacionado con otros carotenoides como la luteína y el β -caroteno; sin embargo, su capacidad antioxidante es 10 veces mayor que la de estos, y 100 veces mayor que la del α -tocoferol, lo que lo ha convertido en uno de los mejores antioxidantes al interrumpir las reacciones en cadena de los radicales libres o reaccionar con ellos para generar productos inofensivos (Lafarga et al., 2021). La producción de astaxantina a escala industrial se lleva a cabo a partir de *H. pluvialis*. Esta microalga en su proceso de crecimiento presenta dos estadios celulares, una forma vegetativa verde y una forma quística roja que se produce cuando el alga es sometida a diferentes condiciones de estrés ambiental (Li et al., 2019). En esta etapa el microorganismo pierde su motilidad, aumenta su tamaño celular, engrosa sus paredes celulares, aumenta la biosíntesis de lípidos y la carotenogénesis, y especialmente acumula ésteres de astaxantina (Kumar Saha et al., 2012).

Para lograr una producción máxima de este carotenoide es necesario cultivar las células en condiciones favorables para obtener una alta biomasa, e

inducir su acumulación en condiciones de estrés, teniendo en cuenta variables como la privación nutricional, irradiación UV-B, salinidad, sequía, y alta intensidad de luz (Shah et al., 2016; Hu et al., 2020). Este último parámetro es considerado el principal factor de inducción y crecimiento microbiano (Zhang et al., 2018), y como es independiente de otros factores secundarios, mejora la acumulación del pigmento (Domínguez et al., 2019).

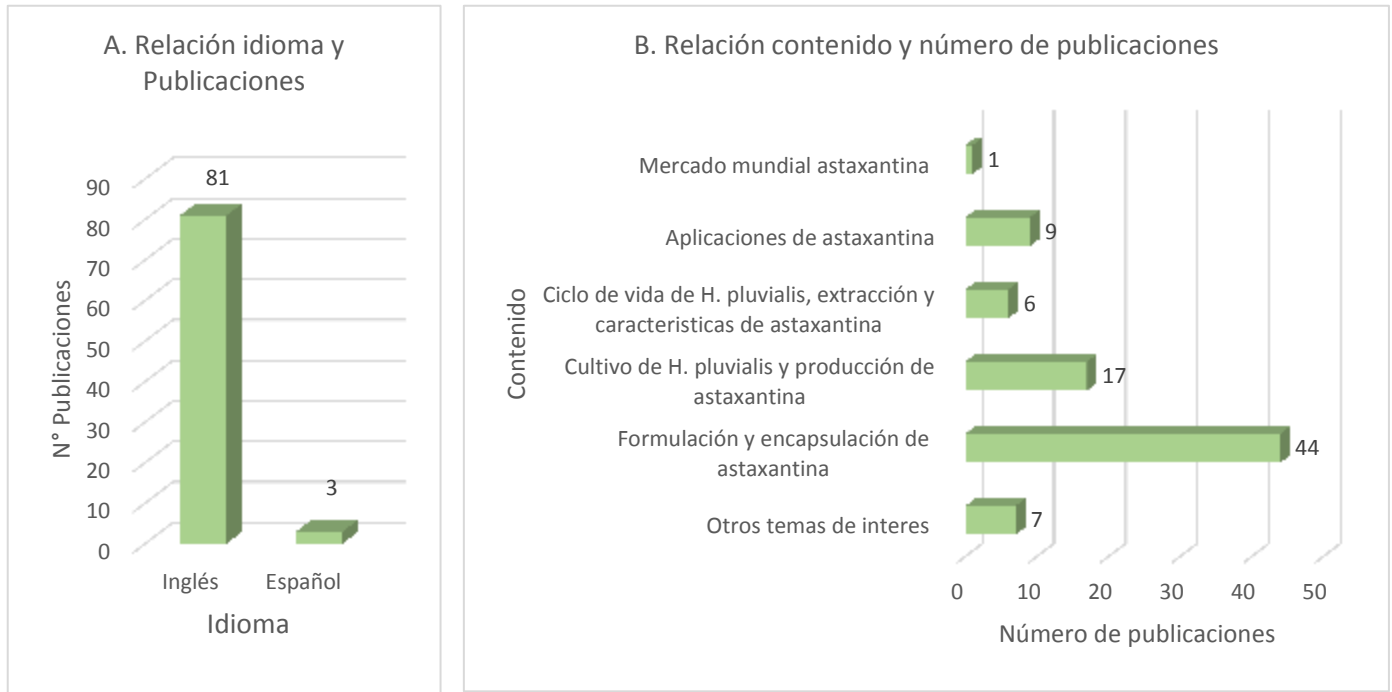
Una vez obtenido el carotenoide, se debe realizar la búsqueda de distintas formulaciones que puedan ayudar a potenciar y posibilitar su uso. En vista de que durante su procesamiento y almacenamiento la astaxantina natural es altamente susceptible a la degradación y descomposición, cuando entra en contacto con oxígeno, luz, pH bajo, enzimas, entre otros (Łupina et al., 2021), es necesaria su formulación utilizando técnicas como emulsificación, liofilización, nanoliposomas, spray drying, entre otras.

La astaxantina como recurso natural, representa una opción para las empresas, ya que al ser aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) puede ser utilizada por la industria farmacéutica, cosmética, y de alimentos como un pigmento (Ambati et al., 2014), ya que su color rojo brillante o naranja, también tiene la capacidad de producir tonos azules o púrpuras al combinarse con proteínas o lipoproteínas (Zhou et al., 2018). De esta manera se lograría reemplazar en gran medida los tintes sintéticos que contaminan los cuerpos de agua y son nocivos para la salud.

Debido a las diferentes aplicaciones y utilidades del carotenoide, se propone como objetivo de esta revisión, conocer las formulaciones de astaxantina para mejorar su biodisponibilidad y aplicación, así como determinar los materiales utilizados y las tecnologías aplicadas en los procesos de formulación. Los estudios fueron organizados y analizados empleando Excel 2016 con diferentes variables por analizar, incluyendo año de publicación, idioma (Figura 1A), temas de estudio y enfoque. Los indicadores bibliométricos evaluados y utilizados fueron citación y contenido (Figura 1B).

El 78.6% de la bibliografía consultada se encuentra en el periodo de tiempo comprendido entre el año 2016 y 2021. Las publicaciones revisadas incluyen 82 artículos, 1 libro, y 1 página web (Figura 1).

Figura 1. A. Relación publicación e idioma. B. Relación contenido y número de publicaciones



Fuente: Elaboración propia

Figura 2. Relación estudios y años de publicación.



Fuente: Elaboración propia

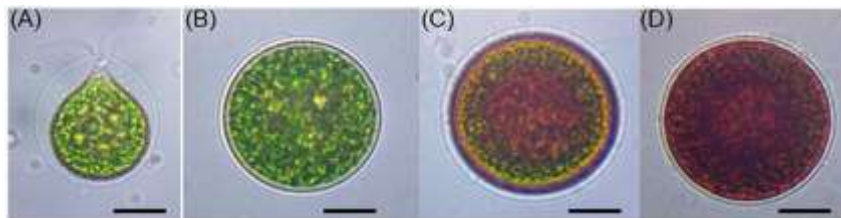
Respecto al indicador de colaboración, en los 82 artículos revisados, se relacionaron 343 autores. Para el caso del indicador de citación, el artículo de Shah et al., 2016 presenta la mayor citación, con un valor de 504.

HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS

El ciclo de vida de *H. pluvialis* se divide en fases según su morfología y fisiología celular. La fase móvil se caracteriza por presentar una pared celular delgada, dos flagelos y crecer por proliferación celular, la fase inmóvil por poseer una pared celular gruesa, sin flagelos y conducir principalmente la producción de astaxantina (Zhang et al., 2016). Esta microalga cuenta con cuatro tipos de morfologías celulares distinguibles durante su vida: macrozooides (zoosporas), microzooides, palmela y hematocistos (aplanosporas) (Shah et al., 2016).

Las zoosporas son células esféricas de 8 a 20 μm de largo con una matriz extracelular gelatinosa, que provienen de la reproducción asexual de una célula madre que, al convertirse en un esporangio, aumenta de tamaño, rompe su pared celular y libera algunas células hijas flageladas denominadas "zoosporas" (Zhang et al., 2016; Shah et al., 2016). Durante la gametogénesis, las aplanosporas pueden producir hasta 64 gametos que se conocen como microzooides, los cuales son de menor tamaño ($<10 \mu\text{m}$) que las zoosporas y presentan una motilidad de alta velocidad. La palmela es una colonia de células que, junto a los microzooides, recibe el nombre de fase vegetativa verde y las aplanosporas son células hijas originadas a través de la reproducción asexual de una célula inmóvil (Shah et al., 2016) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida de *Haematococcus pluvialis*. A. Macrozooides. B. Microzooides. C. Palmela. D. Hematocistos



Fuente: Shah et al., 2016.

En condiciones desfavorables inducidas por diferentes factores de estrés, los macrozooides de *H. pluvialis* empiezan a perder sus flagelos, aumentan de volumen, finalizan la división celular y desarrollan paredes celulares resistentes y gruesas. Es importante resaltar que, si las condiciones de estrés persisten, la palmela tiene la capacidad de transformarse en aplanospora asexual inmóvil, acumulando una gran cantidad de astaxantina en gotitas de lípidos en el citoplasma. (Telli & Şahin, 2020).

RUTA METABÓLICA

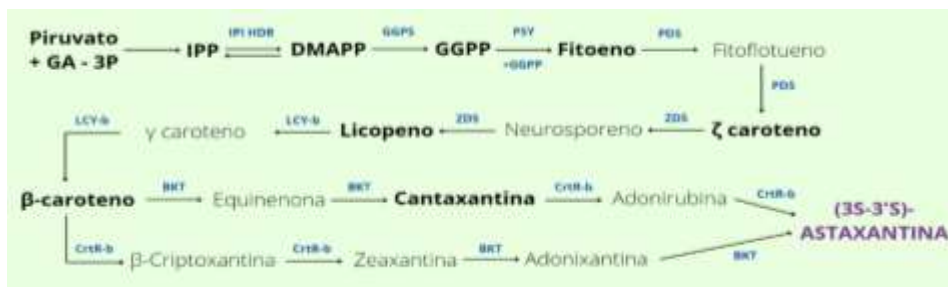
La síntesis de este carotenoide en la microalga *H. pluvialis* ocurre a partir de la vía DOXP (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) o MEP (vía del no mevalonato), la cual cuenta con un conjunto completo de enzimas capaces de realizar la conversión del piruvato y gliceraldehído-3-fosfato en pirofosfato de isopentenilo dentro de los cloroplastos de la microalga (Shah et al., 2016).

Este proceso de biosíntesis comienza con el pirofosfato de isopentenilo (IPP) el precursor de la síntesis de astaxantina (Han, 2013), este sufre una isomerización a dimetilalil difosfato (DMAPP) a través de la isopentenil pirofosfato

isomerasa (IPI). El alargamiento de la cadena isoprenoide empieza con una molécula de DMAPP y diferentes adiciones lineales de tres moléculas de IPP catalizadas por la enzima geranylgeranyl pirofosfato sintasa (GGPS) (Shah et al., 2016). Posteriormente, ocurre la síntesis del fitoeno a partir del difosfato de geranylgeranilo (GGPP) bajo la acción de la fitoeno sintasa (PSY); seguidamente se efectúa la conversión del fitoeno en fitoflueno, y luego en ζ -caroteno mediante la enzima PDS (fitoeno desaturasa) (Cong et al., 2020; Jannel et al., 2020). El ζ caroteno se convierte en neurosporeno y luego en licopeno por la acción de la ζ -caroteno desaturasa (ZDS), y con el fin de formar el β -caroteno, ambos extremos del licopeno experimentan una ciclación catalizada por la β -ciclasa de licopeno (LCY-b) en el cloroplasto (Jannel et al., 2020).

Una vez ya formado, la oxigenación del β -caroteno ocurre a través de la β -caroteno cetolasa (BKT), que se encarga de añadir un grupo ceto en el carbono 4 de uno o ambos anillos del β -caroteno con el fin de formar equinenona y cantaxantina, la cual finalmente se hidroxila en el carbono 3 de los anillos por la β -caroteno hidroxilasa (CrtR-b) para formar adonirrubina y luego astaxantina (Cong et al., 2020; Jannel et al., 2020). Sin embargo, existe una vía alternativa, en la que la CrtR-b añade grupos hidroxilo al β -caroteno a fin de formar β -criptoxantina, después zeaxantina, y luego a adonixantina que posteriormente a través de la BKT se convierte en astaxantina (Jannel et al., 2020) (Figura 4).

Figura 4. Ruta de la biosíntesis de astaxantina a partir *H. pluvialis*



Fuente: Shah et al., 2016.

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE *H. PLUVIALIS*

Durante el ciclo de vida de *H. pluvialis*, su perfil bioquímico presenta variaciones en la proporción de moléculas proteicas, hidratos de carbono y lípidos, dependiendo de su fase, sea vegetativa o quística (Shah et al., 2016).

La microalga en respuesta a los cambios ambientales altera su composición, adaptándose a las diferentes condiciones de crecimiento. En el artículo realizado por Shah et al., 2016 se refleja cómo en situaciones de desarrollo favorables la mayoría de las cepas de *H. pluvialis* son ricas en proteínas en una proporción del 29-45% en la etapa vegetativa, mientras que, en una fase quística, sin los nutrientes necesarios, la contribución de proteínas se estima entre el 21 y 23% del contenido celular. Los hidratos de carbono, por su parte, en la primera etapa, se aproximan al 15-17%; en cambio, cuando este microorganismo se expone a factores de estrés como la deficiencia de nutrientes, variaciones de temperatura, e irradiación UV-B, se evidencia un aumento del 60 al 74% de su contenido total

(Tabla 1). Esto se debe a que carbohidratos como el almidón posibilitan que la célula sobreviva cuando es sometida a un estrés prolongado (Mularczy et al., 2020).

El contenido de lípidos en la fase vegetativa de la célula se encuentra entre el 20-25% y en la fase quística puede acumular hasta el 40% de su peso celular en forma de gotas lipídicas citoplasmáticas (Oslan et al., 2021). En el artículo publicado por Mularczy et al. (2020) se enuncia que el perfil de ácidos grasos de *H. pluvialis* es tan variable que tiene la capacidad de cambiar según su cepa, y que existen factores como la limitación de nitrógeno y fósforo que han demostrado un aumento significativo en la producción de estos; cuando la cantidad de nitrógeno se reduce a 1,7 mM se obtienen alrededor de 7,6% de ácidos grasos en peso seco, en cambio cuando la cantidad es mayor de 4,7 mM la porción de lípidos disminuye, obteniéndose un porcentaje alrededor de 2,1% pp.

Tabla 1. Composición de la biomasa de *H. pluvialis* en etapas de cultivo verde y roja

Contenido de la composición (% de DW)	Etapa verde	Etapa roja
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

Fuente: Shah et al., 2016.

CULTIVO DE LA MICROALGA

Diferentes cambios ambientales generan que *H. pluvialis* presente alteraciones en sus rutas metabólicas, y logre crecer en condiciones fotoautótrofas, heterótrofas y mixotróficas (Oslan et al., 2021; Mota et al., 2021). Básicamente, el metabolismo fotoautótrofo se logra mediante la fotosíntesis, necesitando luz, agua y carbono inorgánico como fuente de energía (Oslan et al., 2021). En el heterótrofo no se emplea la fotosíntesis, debido a que este se ejecuta en la oscuridad tomando carbono orgánico como fuente de energía, y por último en el mixotrófico, la microalga utiliza carbono orgánico e inorgánico de manera simultánea para promover su crecimiento en el metabolismo de fotosíntesis oxigenada y respiración heterotrófica (Mota et al., 2021).

La producción de biomasa de esta microalga unicelular se puede dividir en dos etapas: la fase verde (vegetativa) y la fase roja (quística). En la primera fase, es donde se alcanza el máximo crecimiento celular (Cui et al., 2020), y allí se controlan las condiciones de cultivo con el objetivo de favorecer el aumento, desarrollo, división y mantenimiento de las unidades microalgales (Mota et al., 2021). Luego de lograr una alta densidad celular en esta primera etapa, las células se enfrentan a cambios en las condiciones fisicoquímicas, llevándolas a un punto de estrés favorable para la síntesis de astaxantina (Zhao et al., 2019). Adicionalmente, a la producción del compuesto, ocurre una serie de transformaciones morfológicas

ocasionando un enquistamiento celular junto con la reducción de su división (Mota et al., 2021).

El nitrógeno, nutriente esencial, afecta directamente el crecimiento y la actividad del alga, debido a esto, la acumulación de biomasa se verá favorecida o afectada ya sea por la absorción o el déficit de fuentes de nitrógeno como, nitratos, amoníaco y urea (Oslan et al., 2021). Por lo tanto, las condiciones de inducción poseen un impacto directo con el contenido de astaxantina de las células y la producción de los otros compuestos en ambas fases (Wan et al., 2014). El carbono, otro de los compuestos empleados para la producción y obtención del carotenoide, ha demostrado que al cultivar a *H. pluvialis* en condiciones mixotróficas con ácido acético o acetato, logra una alta concentración de biomasa (Cui et al., 2020).

La producción de la microalga se puede realizar en fotobiorreactores, los cuales proporcionan un aumento en la productividad de la biomasa, las posibilidades de contaminación son menores al existir un mayor control en las condiciones en las que el alga se somete, y es posible una inspección continua de la evolución del cultivo; o en tanques abiertos, los cuales resaltan por sus bajos niveles de inversión y la obtención de resultados óptimos de desarrollo y crecimiento en cultivos a gran escala (Mota et al., 2021).

El proceso de dos pasos para cultivar *H. pluvialis* se ha desarrollado con base en su ciclo de vida. Por un lado, en la primera etapa (fase verde) las células se cultivan en fotobiorreactores para su proliferación y aumento de biomasa, proporcionándoles condiciones necesarias para su crecimiento como: temperatura en un rango de 25 a 30 °C, intensidad de luz menor de 150 μmol fotones m⁻² s⁻¹, irradiación de 40 - 50 μmol de fotones m⁻² s⁻¹, pH de 7, y ciclos de alternancia de luz y oscuridad 12h:12h o 16h:8h (Mularczy et al., 2020). Con el fin de que la microalga presente una adecuada tasa de crecimiento es necesario utilizar medios de cultivos destinados para este fin, por esta razón en la investigación realizada por Castillo et al. (2017) se demostró que los medios de cultivo más empleados para el crecimiento de *H. pluvialis* son el BBM y RM, en donde el RM presenta un recuento celular de 7.55x10⁵ células/ml, y el BBM de 3.88x10⁵ células/ml.

La composición de cada medio de cultivo se presenta a continuación:

Tabla 2. Composición de medio de cultivo RM y BBM

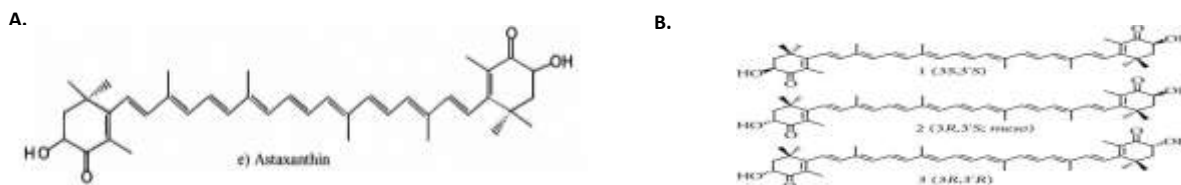
MEDIO DE CULTIVO RM	mg/L	MEDIO DE CULTIVO BBM	mg/L
NaNO ₃	300	KH ₂ PO ₄	175
K ₂ HPO ₄	80	CaCl ₂	25
KH ₂ PO ₄	20	MgSO ₄	75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	NaNO ₃	250
CaCl ₂ ·2H ₂ O	58,5	K ₂ HPO ₄	75
EDTA	7,5	NaCl	25
NaCl	20	H ₃ BO ₃	11,42
H ₃ BO ₃	0,3	ZnSO ₄	8,82 g/L
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,5	MnCl ₂	1,44 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	MoO ₃	0,71 g/L
(NH ₄) ₆ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,3	CuSO ₄	1,57 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08	Co (NO ₃) ₂	0,49 g/L
Co (NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,26	Na ₂ EDTA	50 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	17	KOH	3,1 g/L

Por otro lado, en la segunda fase (etapa roja), las células se transfieren a fotobiorreactores de mayor escala bajo condiciones de deficiencia de nutrientes y estrés para la acumulación y enquistamiento de astaxantina (Li et al., 2020). Gómez et al., (2019) en su investigación demostró que cuando la microalga es sometida a factores de estrés como: deficiencia de nitrógeno al 4,0%, irradiancia de luz de 140 μE , CO_2 al 5%, medio de cultivo RM pH 6,7, fotoperiodo luz/oscuridad 20h:4h (luz blanca) y una temperatura de 25 °C, se obtiene una óptima concentración de astaxantina, siendo esta de $3,52 \times 10^{-6}$ ug/cel. x mL.

ASTAXANTINA

La astaxantina hace parte del grupo de las xantofilas, debido a que su estructura no solamente incluye hidrógeno y carbono, sino también oxígeno (Figura 2). Este carotenoide contiene dos anillos terminales unidos por una cadena de polieno, y dos carbonos asimétricos situados a cada extremo de la molécula en las posiciones 3, 3' del anillo de β -ionona con grupo hidroxilo (-OH) (Ambati et al., 2014). Es importante mencionar que la astaxantina sintética abarca los isómeros (3S, 3'S) (3R, 3'S) y (3R, 3'R). El estereoisómero principal de astaxantina, es decir el 3R, 3'R se encuentra en el krill antártico *Euphausia superba* y principalmente tiene una forma esterificada, mientras que en el salmón salvaje del Atlántico se puede encontrar el 3S, 3'S que se presenta como forma libre. La astaxantina tiene la fórmula molecular $\text{C}_{40}\text{H}_{52}\text{O}_4$, y su masa molar es de 596,84 g/mol (Ambati et al., 2014) (Figura 5).

Figura 5. A. Estructura de la astaxantina. B. Estructura isómeros de astaxantina



Fuente: A. Gajardo et al., 2011. B. Roldan y Mach., 2012

APLICACIONES DE LA ASTAXANTINA

La astaxantina es un compuesto que, al ser reconocido por sus actividades antioxidantes, ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica (Chandra Roy et al., 2021). Este carotenoide cuando es ingerido y absorbido por el intestino delgado actúa como suplemento para una amplia variedad de afecciones como problemas en la piel, el metabolismo, el rendimiento en el ejercicio y el sueño, entre otros (Ito et al., 2018). Básicamente, esto lo consigue al mejorar y mantener el alto potencial de la membrana mitocondrial y proporcionar una protección significativa contra el estrés oxidativo (Satoh, 2016).

Debido a su contenido de ácidos grasos poliinsaturados los sistemas de membranas celulares son vulnerables a los ataques de especies reactivas de oxígeno (ROS), por ello, la astaxantina busca protegerlas al sobreponer sus grupos polares y no polares en los de la membrana celular adoptando una alineación

transmembrana que ayuda a mantener su estructura, disminuir su fluidez, y actuar como un antioxidante (Pereira et al., 2021).

La astaxantina, al atravesar la doble capa de la membrana celular, no solamente tiene la capacidad de capturar los radicales libres en la cadena de polieno conjugado, sino que también en lo que le resta del anillo terminal al eliminarnos tanto en la superficie como al interior de esta, siendo el átomo de hidrógeno en metino C3 un sitio de captura; y el β -caroteno y la vitamina C solo se encuentran dentro y fuera de la bicapa lipídica respectivamente, debido a que la molécula de astaxantina está expuesta tanto al interior como al exterior de la célula, lo cual proporciona una mejor protección general (Yamashita, 2015).

Mediante su unión con radicales libres para formar productos no reactivos y la donación de electrones, la astaxantina elimina ROS y otras especies reactivas como el azufre y el carbono; además, a través de los enlaces conjugados que presenta en la región central no polar, permite que la molécula elimine los electrones de alta energía del interior de la célula, ya que los transporta a lo largo de su propia cadena de carbono, y asegura que estos sean neutralizados por otros antioxidantes que se ubican fuera de la membrana celular, como la vitamina C (Pereira et al., 2021).

PRODUCTOS COMERCIALES DE ASTAXANTINA

Los productos de astaxantina se pueden encontrar en tabletas, cápsulas, jarabes, aceites, geles, cremas, biomasa y polvos granulados, y su precio depende de cómo se empleará. Por ejemplo, para nutracéuticos, cosméticos y aditivos alimentarios tiene un costo aproximado de \$ 2500-7000 por kg, el cual varía según su pureza, en cambio para la acuicultura su costo es alrededor de los \$ 1000 por kg (Gecim et al., 2021).

El costo de producción de la astaxantina sintética es menor en comparación con el de las fuentes naturales, ya que al ser una molécula poco estable y al utilizar petroquímicos en su formulación, puede llegar a ser tóxica y cancerígena, por lo que no se recomienda su uso para fines humanos (Mota et al., 2021).

El mercado de astaxantina superó los USD 650 millones en 2020, pero entre 2021 y 2027 se estima un aumento de más del 5,5% de CAGR (Tasa de Crecimiento Anual Compuesto) (Ahuja & Rawat, 2020). El valor de este carotenoide proveniente directamente de *H. pluvialis*, oscila entre USD 7000 a 15,000 kg⁻¹, pero cuando este proviene de levaduras fermentadas, su precio es de aproximadamente de USD 2500 kg⁻¹, debido a que presenta diferencias en su estructura, menor actividad biológica y restricciones de uso, en comparación con la mencionada anteriormente (Mota et al., 2021).

FORMULACIONES

El uso de la astaxantina en bebidas y alimentos es muy limitado, debido a que presenta gran inestabilidad química, baja biodisponibilidad e hidrofobicidad (Khalid et al., 2017). Existen formas atractivas y prometedoras de superar estas

limitaciones como la encapsulación, un proceso que atrapa una sustancia en otra, produciendo partículas en escala nano, micro, o milimétrica (Serna-Cock & Vallejo-Castillo, 2013), o técnicas de secado por aspersión, y de emulsiones de aceite en agua (Pan-utai et al., 2021; Shu et al., 2018).

La microencapsulación es una técnica que permite proteger diferentes sustancias micro sensibles a cambios externos. Básicamente, es un proceso de envasado de líquidos, sólidos, o sustancias gaseosas como materiales activos a una película de recubrimiento para poder formar cápsulas micrométricas o milimétricas (Ozkan et al., 2019). El ingrediente activo hace referencia al material del núcleo que tiene la capacidad de protegerse temporal o permanentemente dentro de un caparazón de un segundo material, denominado material de encapsulación o de pared (Paulo & Santos, 2017).

Las técnicas de microencapsulación se clasifican en tres grupos: métodos físicos, fisicoquímicos, y químicos (Ozkan et al., 2019). A continuación, se presenta la Tabla 3, que resume cada uno de ellos.

Tabla 3. Técnicas de microencapsulación.

Método	Descripción	Referencia
Físicos		
<i>Spray drying</i> (Secado por aspersión)	Proceso de secado escalable, continuo y de uso intensivo de energía en el que se transforma un fluido en un material sólido; genera partículas de tamaño nanométrico y/o micrométrico.	(Singh & Van den Mooter, 2016)
Liofilización	Proceso de deshidratación que se emplea con el fin de superar la inestabilidad de una suspensión de nanopartículas, de tal manera que se aumenta su vida útil y se facilita su manipulación y almacenamiento.	(Fonte et al., 2016)
Precipitación de fluidos supercríticos	Técnica que se emplea para procesar sólidos que son insolubles en fluidos supercríticos, como por ejemplo el CO ₂ . Esto permite que el soluto se precipite en partículas de un tamaño inferior a 10 micras.	(Braeuer, 2015)
Evaporación de solventes	Técnica empleada para conseguir micro y nanopartículas a base de polímeros preformados. Básicamente consiste en la emulsificación del polímero en fase acuosa y la dispersión en un solvente volátil como diclorometano, cloroformo y acetato de etilo. Posteriormente, el disolvente se evapora a alta temperatura o mediante agitación continua.	(Vinothini & Rajan, 2019)
Fisicoquímicos		
Coacervación	Técnica de separación de sistemas coloidales en dos fases líquidas.	(Eghbal & Choudhary, 2018)
Liposomas	Cápsulas construidas artificialmente de bicapas de fosfolípidos. Comprenden partículas esféricas con tamaños en el rango de nanómetros a micrómetros.	(Ghorbanzade et al., 2017)

Gelificación iónica	Método químico que se basa en interacciones iónicas entre polímeros con carga opuesta, o entre un polímero y un policatión o polianión. Es recomendado para agentes bioactivos hidrofóbicos.	(Benavides et al., 2016)
Químicos		
Polimerización interfacial	Técnica que permite la síntesis de capas funcionales ultrafinas, cápsulas o fibras, en la interfaz entre dos fases, para la generación de membranas o películas poliméricas.	(Raaijmakers & Benes, 2016)

Fuente: Elaboración propia

Como la astaxantina es una molécula muy inestable, se requiere de un proceso de encapsulación que tenga la capacidad de formar una matriz polimérica o un material de pared que proteja su actividad biológica de los factores ambientales (Pan-utai et al., 2021). Por ejemplo, el secado por aspersión permite eliminar los disolventes como el agua para que la sustancia de forma seca conserve sus propiedades principales (Degobert & Aydın, 2021), el liofilizado busca deshidratar la biomasa de las microalgas y preservar su pared celular (Pan-utai et al., 2021), y las emulsiones convencionales o nanoemulsiones de aceite en agua (O/W) constan de dos líquidos inmiscibles, en los que una fase oleosa se dispersa como gotitas en una fase acuosa para mejorar la estabilidad fisicoquímica de la molécula (Khalid et al., 2017).

Estudios han hecho uso de diferentes técnicas de encapsulación con el fin de comprobar qué método es más apropiado para lograr introducir el carotenoide en diferentes productos y aprovechar sus beneficios. Por ejemplo, en la investigación realizada por Pan-utai et al., 2021 denominada *Combination of mechanical and chemical extraction of astaxanthin from Haematococcus pluvialis and its properties of microencapsulation*, se utilizaron técnicas de liofilización para producir polvos de astaxantina, y se emplearon: sondas ultrasónicas para romper las paredes celulares y liberar las sustancias biológicas de las células, maltodextrinas que son productos del almidón hidrolizado utilizadas como materiales de pared para microencapsulación, y goma arábiga, un heteropolisacárido con propiedades de emulsificación.

Los resultados evidenciaron que al combinar estos componentes el proceso de encapsulación tiene una eficacia del 60%, y que los polvos microencapsulados adquieren propiedades como la higroscopicidad, vida útil, actividad del agua (Aw), y el contenido de humedad. De esta manera se demostró que, al utilizar maltodextrina y goma arábiga como materiales de pared y la técnica de liofilización, se obtiene mayor eficiencia de encapsulación del polvo de astaxantina y aumenta la idoneidad para aplicaciones alimentarias, farmacéuticas, entre otras (Pan-utai et al., 2021).

De manera similar, existen artículos que exponen diferentes técnicas de microencapsulación de astaxantina. Por esta razón, de acuerdo con la bibliografía consultada, a continuación se presenta un cuadro que resume el nombre de la formulación, el método de formulación, los reactivos y materiales utilizados, la eficiencia del proceso y aplicación del producto.

Tabla 4. Formulaciones de astaxantina obtenida a partir de *H. pluvialis*.

Formulación	Método	Materiales	Eficiencia	Aplicación	Autor
Microcápsulas (Rango: 95.39 ± 5.66 - $233,57 \pm 87,48 \mu\text{m}$)	Microencapsulación y liofilización	Aceite de girasol refinado, maltodextrina, goma arábiga, Tween 80, acetona, etanol y acetato de etilo	67 - 71%	Alimentos, piensos y la industria nutracéutica	1. (Pan-utai et al., 2021)
Microcápsulas	Emulsificación y secado por aspersion (Spray drying)	Emulsión Pickering de grado alimenticio, oleoresina de astaxantina, proteína de altramuz, aceite de girasol, y maltodextrina.	40 - 92% para ambos polvos secados a 140°C y a 160°C .	Alimentos funcionales	2. (Burgos-Díaz et al., 2020)
Nanoliposomas ($80,31 \pm 1,80 \text{ nm}$)	Técnica ultrasónica de dispersión de película	Fosfatidil celona de soja (SPC), RCP, colesterol, cloroformo, tampón de fosfato de $0,05 \text{ mol/L}$ (PBS, pH 7,4), y nitrógeno	$97,49 \pm 0,27\%$	Farmacéuticos y alimentos	3. (Pan et al., 2018)
Microcápsulas (Rango: $1,68 \pm 0,18$ - $2,46 \pm 0,10 \text{ mm}$)	Técnica de gelificación iónica externa	Alginato de sodio, oleoresina de astaxantina, polisorbato 80 (tensoactivo), y cloruro de calcio, HCl, acetato de sodio/etanol, aceite de soja	$66,7 \pm 3,6$ - $82,1 \pm 3,0 \%$	Alimentos	4. (Niizawa et al., 2019)
Nanopartículas (80 a 130 nm)	Técnica de emulsificación/ evaporación de solventes	Proteína de suero, oleoresina de <i>H. pluvialis</i> , acetato de etilo, HCl, y tripsina	$96,0\% \pm 2,5\%$	Suplementos para las dietas de humanos y animales	5. (Zanoni et al., 2019)
Nanopartículas ($0.228 \mu\text{m}$)	Técnica de dispersión mejorada en solución por fluidos supercríticos (SEDS)	Dióxido de carbono supercrítico, diclorometano, etanol, y PHBV	51,21%	Bioproductos con aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica.	6. (Machado et al., 2016)
Liposomas ($225,0 \pm 58,3 \text{ nm}$)	Método de sonicación por evaporación	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC), colesterol, lecitina, metanol, y cloroformo	98%	Medicamentos con potencial para tratar enfermedades hepáticas inducidas por el alcohol.	7. (Wu et al., 2019)
Microcápsulas (diámetro medio inferior a $2,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$)	Método de separación de fases y liofilización	Zeína, oligoquitosano, etanol, hexano, agua desionizada, acetato de etilo, nitrógeno, hexano	$94,34 \pm 0,64\%$	Alimentos	8. (Jiang & Zhu, 2019)

Microcápsulas (4 mm en promedio (4000 μ m))	Emulsificación en perlas de alginato - quitosano	Solución de alginato en fase acuosa, solución de quitosano, cloruro de calcio, etanol	Más del 90%	Alimentos – Yogurt	9. (Taksima et al., 2015)
Microcápsulas (1,88 y 0,60 μ m)	Emulsiones multicapa, y liofilización	Proteína de suero, goma persa, extracto de aceite rico en astaxantina, acetato de etilo,	42,9-49,8 (g de astaxantina/100 g de astaxantina)	Bebida modelo de agua, azúcar y ácido cítrico. Colorante natural.	10. (Bassijeh et al., 2020)
Nanoliposomas (~ 150 nm)	Evaporación en emulsión y liofilización	Liposol de lecitina, solución de cloroformo, sacarosa (crioprotector)	98,8%	Alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos	11. (Oh et al., 2020)
Microcápsulas (Rango: 8,23 \pm 0,37 - 206,55 \pm 7,85 μ m)	Doble emulsión	Aceite de soja, Tween 20, almidones gelatinizados, agua desionizada, amilosa	57,54 \pm 1,88%	Alimentos, bebidas y nutracéuticos	12. (Yang et al., 2021)
Microesferas (Rango: 585 ~ 724 nm)	Emulsión doble	Alginato de calcio, alginato de sodio, cloruro de calcio, etanol, parafina	87,2%	Farmacéutico - tratamiento del carcinoma hepatocelular	13. (Zhang et al., 2019)
Microcápsulas	Secado por aspersión (Spray drying)	Maltodextrina, gelatina, monoestearato de glicerol, oleoresina de astaxantina, éster de ácido graso de sacarosa, éter acético	71,76%	Alimentos	14. (Zhao et al., 2019)

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar que la formulación más utilizada corresponde a las microcápsulas. Posiblemente este resultado pueda atribuirse a que permite proteger y aumentar la bioactividad de la astaxantina, potencia sus sabores y aromas específicos, y enmascara olores y sabores indeseables (Paulo & Santos, 2017). Utilizar este tipo de formulación trae consigo muchas ventajas, como reducir la reactividad del compuesto con factores externos, controlar su liberación del núcleo y, además, tener la capacidad de evitar la pérdida de enzimas, proteínas y carotenoides (Estevinho et al., 2013).

En contraste, las nanopartículas tienen la capacidad de cruzar las barreras de permeabilidad y mejorar la absorción y la biodisponibilidad de algunos fármacos (Najafi et al., 2020). Encapsular astaxantina en sistemas coloidales menores a 100 nm podría mejorar la captación celular y, por lo tanto, su biodisponibilidad, pero como es imprescindible utilizar en el proceso el pigmento puro, su costo elevado representa

un gran obstáculo para la industria farmacéutica, alimentaria y/o cosmética (Zanoni et al., 2019).

Los liposomas y/o nanoliposomas también representan un enfoque prometedor al atrapar, proteger y liberar de manera controlada nutraceuticos y agentes bioactivos en la industria alimentaria (Peng et al., 2019). Por un lado, estabilizan de manera más eficiente la formulación y, por el otro, los lípidos que se emplean son biocompatibles y completamente tolerados por el cuerpo, como los triglicéridos, ácidos grasos y esteroides (Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018).

En los estudios de Pan-utai et al. (2021), Jiang & Zhu (2019), Bassijeh et al. (2020) y Oh et al. (2020) se emplearon métodos para la encapsulación de astaxantina, como la microencapsulación (EE 67-71%), separación de fases ($94,31 \pm 0,64\%$), emulsión multicapa (42,9-49,8g de astaxantina) y evaporación en emulsión (98,8%). Sin embargo, los autores descritos concuerdan al utilizar la liofilización en sus estudios como un método de secado. Esta técnica es reconocida por disminuir la descomposición química, eliminar agua sin que haya calentamiento excesivo y generar mayor estabilidad del producto en estado seco (Nireesha et al., 2013), pero como es un método que representa altos costos de operación y largos tiempos de procesamiento (Patel & Pikal, 2013), muchas industrias han optado por implementar otro tipo técnicas más económicas y ágiles en su operación como *spray drying*.

El secado por aspersión o *spray drying* es otro método que, aunque solo ha sido presentado por los de Burgos-Díaz et al. (2020) y Zhao et al. (2019) y es bien utilizado en numerosas industrias, principalmente en la alimentaria. Es un método que busca convertir diferentes líquidos en polvos que presenten un nivel aceptable de degradación y oxidación de compuestos volátiles (Keshani et al., 2015). Además, es ampliamente utilizado por las grandes fábricas, ya que proporciona una gran superficie en forma de gotas finas a través de la atomización en la cámara de secado, lo que conduce a que se generen partículas de polvo de forma regular y esférica (Shishir & Chen, 2017). Esta técnica se ha considerado como una de las más económicas, debido a que sus gastos operativos son bajos y, de hecho, ha logrado demostrar que puede llegar a ser entre 4 a 5 veces más económica que la liofilización al ser su tiempo de secado corto y consumir menos electricidad (Shishir & Chen, 2017). Por lo tanto, como representa una excelente alternativa para reemplazar este proceso, se recomienda su uso para obtener una buena encapsulación del compuesto bioactivo.

Como se puede apreciar en la Tabla 4 se enuncian diferentes técnicas de microencapsulación, y existen varias de ellas que presentan porcentajes de encapsulación mayores al 90% (Burgos-Díaz et al, 2020), (Jiang & Zhu, 2019), (Taksima et al, 2015). Para poder entender el concepto, es necesario saber que la eficiencia de encapsulación (EE) lo que busca es conocer si el material de pared es lo suficientemente potente para mantener el material del núcleo dentro de la cápsula.

Ahora bien, la primera técnica con una Eficiencia de Encapsulación (EE) mayor al 90% corresponde a la emulsificación y secado por aspersión. Según sus autores (Burgos-Díaz et al., 2020), al someter la astaxantina microencapsulada en su fase oleosa, y posteriormente a secado por aspersión utilizando como material de pared mezclas de agregados de proteínas de altramuz y maltodextrina a diferentes concentraciones, se obtiene que la mayor EE se encuentra alrededor del 92 % cuando

se utiliza 6% de agregados de proteínas, pero cuando esta proporción disminuye así mismo lo hace la EE. De esta manera se puede llegar a concluir que el material de pared es clave para que se lleve a cabo la correcta formación de la “capa protectora” que preserve el material del núcleo y haya una mayor retención de astaxantina durante el secado por aspersión y una menor oxidación del compuesto encapsulado (Burgos-Díaz et al., 2020).

Adicionalmente, se puede observar que los estudios de Wu et al. (2019) y Oh et al. (2020) presentan la mayor EE, con un porcentaje de alrededor del 98%. En primer lugar, en el estudio realizado por Wu et al., 2019, mediante la técnica de sonicación por evaporación se fabricaron liposomas utilizando una mezcla de 1,2-diestearoil-La sn -glicero-3-fosfolina (DSPC), colesterol, lecitina y astaxantina disueltos en metanol: cloroformo, con un tamaño de $225,0 \pm 58,3$ nm de diámetro. Al sintetizar los encapsulados, se decidió investigar el potencial terapéutico en ratones con fibrosis hepática alcohólica encontrándose que, el tratamiento con este tipo de encapsulado a través de la vía intraperitoneal tiene la capacidad de distribuirse rápidamente en la cavidad abdominal de los ratones y tener un efecto reparador en las lesiones hepáticas. Esto indica que la baja biodisponibilidad del carotenoide puede mejorarse después de la encapsulación y ser un agente terapéutico, protector, restaurador y antioxidante a nivel hepático (Wu et al., 2019).

En segundo lugar, en el estudio realizado por Oh et al. (2020), a través del método de evaporación de emulsión simple se desarrollaron nanoliposomas de lecitina portadores de astaxantina y, posteriormente, para mejorar su estabilidad de almacenamiento, se liofilizaron utilizando sacarosa a manera de crioprotector. De esta manera buscaron mostrar la actividad antioxidante del carotenoide y su eficacia en la cicatrización de heridas *in vitro*. Como resultado se obtuvo que los nanoliposomas presentaban forma esférica, un tamaño alrededor de los 150 nm, y una EE del 98.8%.

Al comparar los estudios de anteriores se logra identificar que, en ambos se utiliza lecitina, debido a que además de ser un material capaz de retener en la bicapa lipídica de la membrana celular sustancias solubles en aceite como la astaxantina (Varona et al., 2013), también protege el carotenoide contra la oxidación. La lecitina consiste en una mezcla de glicerofosfolípidos naturales, que son bien conocidos por sus funciones en la señalización celular y por ser ampliamente utilizados como solubilizantes, emulsionantes y componentes principales de estructuras coloidales como los liposomas (Nasab et al., 2019).

Los autores Pan et al. (2018), Wu et al. (2019) y Oh et al. (2020) obtuvieron las EE más altas, y coinciden en su formulación; es decir, liposomas. Los estudios de Pan et al. (2018) y Wu et al. (2019) se asemejan en uno de los materiales de pared utilizados; es decir, el colesterol, y los de Wu et al. (2019) y Oh et al. (2020), en lecitina. Como es evidente estos fosfolípidos representan los principales bloques de construcción de los liposomas (Ajeeshkumar et al., 2021). Por un lado, se recomienda utilizar lecitina de soja en este tipo de formulación, debido a que se considera más segura, económica, y estable desde el punto de vista de la producción (Le et al., 2019) y, por otro lado, es aconsejable el uso del colesterol, debido a que podría aumentar el empaquetamiento de lecitina, reducir la fuga de liposomas y disminuir la agregación de los mismos (Sun et al., 2019).

Como los liposomas presentan una eficiencia de encapsulación alrededor del 98%, se puede concluir que estos al utilizar materiales de producción económicos y amigables con el medio ambiente, han atraído una atención creciente en la industria, y han sido ampliamente utilizados para la encapsulación de fármacos, componentes bioactivos, enzimas, y sustancias antimicrobianas (Sun et al., 2019). Así mismo, cabe mencionar que, representan una de las mejores alternativas para servir como vehículos de compuestos bioactivos como la astaxantina en sistemas de administración exitosos (Ajeeshkumar et al., 2021).

Desde otra perspectiva, en cuanto a los materiales utilizados para realizar el proceso de encapsulación, se puede evidenciar que los autores, Burgos-Díaz et al. (2020) y Zhao et al. (2019) utilizaron maltodextrina como material de pared por su bajo costo y alta efectividad. Entre sus características más destacables se encuentran que es inodora, incolora, presenta baja viscosidad a altas concentraciones, permite la formación de polvos de libre flujo y está disponible en diferentes pesos moleculares. (Parra & Huertas, 2010). Sin embargo, a pesar de todas sus propiedades, se demostró que, al mezclarla junto con otro material como la goma arábica se obtienen mejores resultados para proteger la pared y evitar la oxidación del compuesto.

Otro material bien utilizado es la goma persa que, aunque se utiliza indistintamente junto con la goma arábica, tiene dos fracciones solubles en agua que pueden formar complejos electrostáticos para mejorar la estabilidad oxidativa de distintas emulsiones (Bassijeh et al., 2020). Además, esta al presentar mayor viscosidad y al aumentar el tamaño de la gota de emulsión, tiene la capacidad de estabilizar de mejor manera las emulsiones en comparación con la goma arábica (Hadian et al., 2016). Por lo tanto, se recomienda su uso como material de encapsulación.

El alginato de calcio, utilizado como portador de compuestos bioactivos, es otro material de encapsulación conocido por sus propiedades biológicas, biodegradables, biocompatibles y sensibles al pH. En el estudio realizado por Zhang et al. (2020), se prepararon microesferas de alginato de calcio y se investigó el comportamiento de liberación de las micropartículas a diferentes niveles de pH con el fin de encapsular astaxantina y demostrar su potencial terapéutico en el tratamiento del carcinoma hepatocelular. En primer lugar, los resultados indicaron que la eficiencia de encapsulación del carotenoide en microesferas de alginato de calcio corresponde a 87.2% y, por lo tanto, indica que este material tiene la capacidad de proteger el pigmento y mejorar su biodisponibilidad. En segundo lugar, la tasa de liberación de astaxantina encapsulada en solución alcalina (cerca al 50%) fue mayor que la de la solución ácida (inferior al 10%), lo que evidenció que las micropartículas tenían la capacidad de resistir el ambiente ácido del estómago. De esta manera se logra demostrar que el alginato de calcio es un material de pared eficaz para mejorar la biodisponibilidad de la astaxantina y evitar la liberación del carotenoide en ambientes ácidos como los del estómago que podrían causar su deterioro.

En la Tabla 3 se puede observar cómo los Autores Pan-utai et al.,2021 y Yang et al.,2021, utilizan tween 80 y tween 20 como emulsionantes sintéticos para evitar la descomposición y así fabricar sistemas de administración coloidal para nutraceuticos hidrófobos (Liu et al., 2016). Sin embargo, como no son amigables ambientalmente, en el estudio de Zaroni et al.,2019, consiguen reemplazarlos por proteínas de suero las cuales permiten facilitar la formación y mejorar la estabilidad de la emulsión

(Liu et al., 2016). Estas moléculas se han utilizado para estabilizar emulsiones que tengan un alto contenido de carotenoides como el β -caroteno, el licopeno y la luteína, debido a que tienen la capacidad de formar una capa protectora en torno a las gotitas y protegerlas de la agregación a causa de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Shen et al., 2019).

Debido estas implicaciones es relevante comprender que, la astaxantina al ser un compuesto lipofílico, tiene la capacidad de disolverse en solventes y aceites (Ambati et al., 2014). En la investigación denominada Thermal stability of astaxanthin in oils for its use in fish food technology realizada por Calvo, et al. (2020), se buscó evaluar si la estabilidad del carotenoide se ve afectada por la presencia de aceite de soja y girasol, y butilhidroxitolueno (BHT), un antioxidante sintético que evita la oxidación del carotenoide. Para esto la astaxantina se disolvió en ambos aceites con BHT, utilizando temperaturas de 25 ° C y 180 ° C.

A manera de resultados se obtuvo que, al disolver la astaxantina en aceite de soja sin BHT su porcentaje fue de $95 \pm 1\%$, y con BHT fue de $96 \pm 6\%$; en aceite de girasol con y sin BHT fue de $96 \pm 1\%$ y $76 \pm 1\%$, respectivamente (Calvo et al., 2020). Es evidente que el BHT mejoró los porcentajes de astaxantina; sin embargo, al ser este un antioxidante sintético y provenir de la industria petrolera, no se recomienda para tal fin, debido a que es nocivo para la salud y el medio ambiente. Aunque el aceite de girasol contiene vitamina E, no es muy aconsejable su uso sin un antioxidante sintético, pese a que por sí solo no podría mantener en gran medida la estabilidad del pigmento. No obstante, para evitar el uso de sustancias nocivas para la salud y el medio ambiente, se recomienda utilizar aceite de soja, en vista de que el porcentaje de pérdida de astaxantina no fue tan alto cuando se evitó el uso de BHT.

El etanol es un compuesto orgánico utilizado ampliamente en la industria alimentaria porque además de ser un solvente GRAS (generalmente reconocido como seguro) según la FDA (de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos), es razonablemente económico y menos tóxico (Ziyatdinova & Budnikov, 2018). Se recomienda el uso del etanol como solvente para lograr el máximo rendimiento de extracción de astaxantina (Pan-utai et al., 2021), y como disolvente de lavado en el proceso de encapsulación, debido a que el carotenoide presenta una solubilidad relativamente baja en este y, por lo tanto, puede eliminarse el material no encapsulado sin dañar la pared del polímero (Machado et al., 2014).

Por último, se encuentran las aplicaciones y, como es evidente, las formulaciones consultadas buscan implementar el carotenoide ya sea en alimentos, farmacéuticos o cosméticos, debido a sus propiedades nutricionales, antioxidantes, e inmunomoduladoras. Por ejemplo, se destaca la investigación realizada por Taksima et al. (2015), debido a que en se logró encapsular el cortenoide en perlas de alginato-quitosano y se demostró que el yogur, al ser parte de la dieta humana, presenta gran potencial para incluir ingredientes funcionales como la astaxantina en su formulación. La aceptación por los consumidores fue satisfactoria al lograr un agrado superior a 6 puntos (escala de 9 puntos), una intención de compra del 95,6%, y una aceptación positiva del 86,2%.

CONCLUSIONES

En esta revisión se reúnen las formulaciones más relevantes para la optimización, preservación y potenciación de astaxantina producida por *H. pluvialis*. Esta microalga cuando es sometida a condiciones ambientales extremas se caracteriza por ser la fuente más promisoría del carotenoide alcanzando concentraciones de $3,52 \times 10^{-6}$ ug/cel. x mL. A través de su producción se han logrado proporcionar herramientas teóricas con resultados experimentales explorados para la biotecnología y sus aplicaciones en el campo industrial, farmacéutico, nutracéutico y alimenticio.

Anteriormente, la producción biológica de astaxantina no proporcionaba una rentabilidad significativa, principalmente por su inestabilidad química, baja biodisponibilidad e hidrofobicidad, baja resistencia a cambios de pH, aumentos de temperatura y exposición prolongada a diferentes niveles de intensidad lumínica. Con el fin de preservar sus propiedades antioxidantes, antiproliferativas, y antiinflamatorias, se han encontrado que la formulación más utilizada son las microcápsulas por las ventajas que tiene producidas por *spray drying*, emulsificación, gelificación, entre otras, con los cuales se ha demostrado que el carotenoide se preserva, conserva sus características y logra ser usado como compuesto bioactivo y colorante.

La formulación más empleada para proteger la astaxantina de las condiciones adversas, mejorar su biodisponibilidad y aplicabilidad corresponde a la microencapsulación, cuya metodología evita alteraciones en las propiedades del carotenoide y generan gran estabilidad durante su procesamiento y almacenamiento. De las técnicas analizadas, la evaporación en emulsión y la liofilización lograron la mayor EE (98.8%) y demostraron tener mayor capacidad para atrapar el carotenoide; los materiales utilizados como la maltodextrina, lecitina, colesterol, aceite de soja, entre otros, para proteger la pared, evitar la oxidación, y estabilizar el carotenoide, son recomendados al ser económicos, estables y amigables con el medio ambiente. Evidentemente, la encapsulación del carotenoide es necesaria para proteger este compuesto bioactivo de condiciones ambientales adversas y abrir la posibilidad de su uso a partir de *H. pluvialis* en el mercado mundial.

RECOMENDACIONES

Este artículo contribuye y aporta fundamentos a futuras investigaciones enfocadas en la producción y encapsulación de compuestos bioactivos como la astaxantina.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de investigación Bioprocesos y Control de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

REFERENCIAS

Ahuja K., & Rawat A. (2020). Astaxanthin Market Size, Share | Global Projections 2021-2027. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/astaxanthin-market>

Ajeeshkumar, K. K., Aneesh, P. A., Raju, N., Suseela, M., Ravishankar, C. N., & Benjakul, S. (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1280–1306. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725>

Ambati, R. R., Phang, S.-M., Ravi, S., & Aswathanarayana, R. G. (2014). Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications—A Review. *Marine Drugs*, 12(1), 128–152. <https://doi.org/10.3390/MD12010128>

Bassijeh, A., Ansari, S., & Hosseini, S. M. H. (2020). Astaxanthin encapsulation in multilayer emulsions stabilized by complex coacervates of whey protein isolate and Persian gum and its use as a natural colorant in a model beverage. *Food Research International*, 137, 109689. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109689>

Benavides, S., Cortés, P., Parada, J., & Franco, W. (2016). Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. *Food Chemistry*, 204, 77–83. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.02.104>

Braeuer, A. (2015). High Pressure: Fellow and Opponent of Spectroscopic Techniques. *Supercritical Fluid Science and Technology*, 7, 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63422-1.00001-8>

Burgos-Díaz, C., Opazo-Navarrete, M., Soto-Añual, M., Leal-Calderón, F., & Bustamante, M. (2020). Food-grade Pickering emulsion as a novel astaxanthin encapsulation system for making powder-based products: Evaluation of astaxanthin stability during processing, storage, and its bioaccessibility. *Food Research International*, 134, 109244. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109244>

Calvo, N. S., Reynoso, C. M., Resnik, S., Cortés-Jacinto, E., & Collins, P. (2020). Thermal stability of astaxanthin in oils for its use in fish food technology. *Animal Feed Science and Technology*, 270, 114668. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2020.114668>

Castillo, N. C. M., Rivera, R. C., Díaz, L. E., & Díaz, L. A. G. (2017). Evaluación de las condiciones de crecimiento celular para la producción de astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. *Nova*, 15(28), 19-31. <https://doi.org/10.22490/24629448.2073>

Chandra Roy, V., Ho, T. C., Lee, H. J., Park, J. S., Nam, S. Y., Lee, H., Getachew, A. T., & Chun, B. S. (2021). Extraction of astaxanthin using ultrasound-assisted natural deep eutectic solvents from shrimp wastes and its application in bioactive films. *Journal of Cleaner Production*, 284, 125417. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.125417>

Cong, X., Zang, X., Dong, M., Wang, Z., He, B., Hou, L., Wei, X., Zhang, F., Shang, M., Yangzong, Z., Li, R., & Zhang, X. (2020). Accumulation of phytoene and astaxanthin and related genes expression in *Haematococcus pluvialis* under sodium acetate stress. *Aquatic Biology*, 29, 155–164. <https://doi.org/10.3354/ab00733>

Davinelli, S., Nielsen, M. E., & Scapagnini, G. (2018). Astaxanthin in Skin Health, Repair, and Disease: A Comprehensive Review. *Nutrients*, 10(4), 522. <https://doi.org/10.3390/NU10040522>

Degobert, G., & Aydin, D. (2021). Lyophilization of Nanocapsules: Instability Sources, Formulation and Process Parameters. *Pharmaceutics*, 13(8), 1112. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13081112>

Eghbal, N., & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT*, 90, 254–264. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.12.036>

Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 138–155. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2013.04.001>

Fonte, P., Reis, S., & Sarmento, B. (2016). Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 225, 75–86. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.01.034>

Gecim, G., Aydin, G., Tavsanoglu, T., Erkoc, E., & Kalemteas, A. (2021). Review on extraction of polyhydroxyalkanoates and astaxanthin from food and beverage processing wastewater. *Journal Of Water Process Engineering*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101775>

Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 13(4), 288. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.235156>

Ghorbanzade, T., Jafari, S. M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2017). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*, 216, 146–152. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2016.08.022>

Gómez, L., Orozco, M. I., Quiroga, C., Díaz, J. C., Huérfano, J., Díaz, L. E. & Camacho, J. E. (2019). Producción de Astaxantina y expresión de genes en *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales) bajo condiciones de estrés por deficiencia de nitrógeno y alta irradiancia. *Mutis*, 9(2), 7-24. <https://doi.org/10.21789/22561498.1532>

Hadian, M., Hosseini, S. M. H., Farahnaky, A., Mesbahi, G. R., Yousefi, G. H., & Saboury, A. A. (2016). Isothermal titration calorimetric and spectroscopic studies of β -lactoglobulin-water-soluble fraction of Persian gum interaction in aqueous solution. *Food Hydrocolloids*, 55, 108–118. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2015.11.006>

Han, D., Li Y., & Hu Q. (2013). Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications. *ALGAE*, 28(2), 131–147. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2013.28.2.131>

Hu, C., Cui, D., Sun, X., Shi, J., & Xu, N. (2020). Primary metabolism is associated with the astaxanthin biosynthesis in the green algae *Haematococcus pluvialis* under light stress. *Algal Research*, 46, 101768. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2019.101768>

Ito, N., Saito, H., Seki, S., Ueda, F., & Asada, T. (2018). Effects of Composite Supplement Containing Astaxanthin and Sesamin on Cognitive Functions in People with Mild Cognitive Impairment: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, 62, 1767–1775. <https://doi.org/10.3233/JAD-170969>

Jannel, S., Caro, Y., Bermudes, M., & Petit, T. (2020). Novel Insights into the Biotechnological Production of *Haematococcus pluvialis*-Derived Astaxanthin: Advances and Key Challenges to Allow Its Industrial Use as Novel Food Ingredient. *Journal of Marine Science and Engineering* 2020, 8(10), 789. <https://doi.org/10.3390/JMSE8100789>

Jiang, G. L., & Zhu, M. J. (2019). Preparation of astaxanthin-encapsulated complex with zein and oligochitosan and its application in food processing. *LWT*, 106, 179–185. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.02.055>

Joshi, D., & Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal Of Pharmaceutical Research International*, 28(3), 10. <https://doi.org/10.9734/jpri/2019/v28i330203>

Keshani, S., Daud, W. R. W., Nourouzi, M. M., Namvar, F., & Ghasemi, M. (2015). Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. *Journal of Food Engineering*, 146, 152–162. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2014.09.004>

Khalid, N., Shu, G., Holland, B. J., Kobayashi, I., Nakajima, M., & Barrow, C. J. (2017). Formulation and characterization of O/W nanoemulsions encapsulating high concentration of astaxanthin. *Food Research International*, 102, 364–371. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.06.019>

Khoo, K. S., Lee, S. Y., Ooi, C. W., Fu, X., Miao, X., Ling, T. C., & Show, P. L. (2019). Recent advances in biorefinery of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 288, 121606. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121606>

Kumar Saha, S., Mchugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., & Murray, P. (2012). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 128, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.049>

Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Morillas-España, A., & Ación-Fernández, F. G. (2021). Extremophile microalgae as feedstock for high-value carotenoids: A review. *International Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1111/IJFS.15069>

Le, N. T. T., Cao, V. Du, Nguyen, T. N. Q., Le, T. T. H., Tran, T. T., & Thi, T. T. H. (2019). Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4706. <https://doi.org/10.3390/IJMS20194706>

Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169–183. <https://doi.org/10.1089/IND.2013.0039>

Li, F., Cai, M., Lin, M., Huang, X., Wang, J., Zheng, X., Wu, S., & An, Y. (2019). Accumulation of Astaxanthin Was Improved by the Nonmotile Cells of *Haematococcus pluvialis*. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2019/8101762>

Li, X., Wang, X., Duan, C., Yi, S., Gao, Z., & Xiao, C. et al. (2020). Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107602>

Liu, X., McClements, D. J., Cao, Y., & Xiao, H. (2016). Chemical and Physical Stability of Astaxanthin-Enriched Emulsion-Based Delivery Systems. *Food Biophysics*, 11(3), 302–310. <https://doi.org/10.1007/S11483-016-9443-6>

Łupina, K., Kowalczyk, D., Lis, M., Raszewska-Kaczor, A., & Drożdowska, E. (2021). Controlled release of water-soluble astaxanthin from carboxymethyl cellulose/gelatin and octenyl succinic anhydride starch/gelatin blend films. *Food Hydrocolloids*, 123, 107179. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.107179>

Machado, F. R. S., Reis, D. F., Boschetto, D. L., Burkert, J. F. M., Ferreira, S. R. S., Oliveira, J. V., & Burkert, C. A. V. (2014). Encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* in PHBV by means of SEDS technique using supercritical CO₂. *Industrial Crops and Products*, 54, 17–21. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.01.007>

Machado, F. R. S., Trevisol, T. C., Boschetto, D. L., Burkert, J. F. M., Ferreira, S. R. S., Oliveira, J. V., & Burkert, C. A. V. (2016). Technological process for cell disruption, extraction and encapsulation of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 218, 108–114. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2015.12.004>

Mota, G. C. P., Moraes, L. B. S. de, Oliveira, C. Y. B., Oliveira, D. W. S., Abreu, J. L. de, Dantas, D. M. M., & Gálvez, A. O. (2021). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*: processes, applications, and market. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1966802>

Mularczyk, M., Michalak, I., & Marycz, K. (2020). Astaxanthin and other Nutrients from *Haematococcus pluvialis*—Multifunctional Applications. *Marine Drugs*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/MD18090459>

Najafi, D., Taheri, R. A., Najafi, A., Shamsollahi, M., & Alvarez-Rodriguez, M. (2020). Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. *Poultry Science*, 99(3). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.12.006>

Nasab, M. E., Takzaree, N., Saffaria, P. M., & Partoazar, A. (2019). In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: a comparative study. *Journal of Comparative Effectiveness Research*, 8(8), 633–643. <https://doi.org/10.2217/CER-2018-0128>

Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2019). Natural astaxanthin encapsulation: Use of response surface methodology for the design of alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 601–608. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.044>

Nireesha, G., Divya, L., Sowmya, C., Venkateshan, N., Niranjana Babu, M., & Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/Freeze Drying - An Review. *International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences*, 3(4), 87-98. <https://scienztech.org/index.php/ijntps/article/view/96>

Oh, H., Lee, J. S., Sung, D., Lim, J.-M., & Choi, W. II. (2020). Potential Antioxidant and Wound Healing Effect of Nano-Liposomal with High Loading Amount of Astaxanthin. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9231. <https://doi.org/10.2147/IJN.S272650>

Oslan, S. N. H., Shoparwe, N. F., Yusoff, A. H., Rahim, A. A., Chang, C. S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Arumugam, K., Ariff, A. Bin, Sulaiman, A. Z., & Mohamed, M. S. (2021). A Review on *Haematococcus pluvialis* Bioprocess Optimization of Green and Red Stage Culture Conditions for the Production of Natural Astaxanthin. *Biomolecules* 11(2), 256. <https://doi.org/10.3390/BIOM11020256>

Oslan, S., Tan, J. S., Oslan, S. N., Matanjun, P., Mokhtar, R., Shapawi, R., & Huda, N. (2021). *Haematococcus pluvialis* as a Potential Source of Astaxanthin with Diverse Applications in Industrial Sectors: Current Research and Future Directions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(21), 6470. <https://doi.org/10.3390/molecules26216470>

Ozkan, G., Franco, P., De Marco, I., Xiao, J., & Capanoglu, E. (2019). A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. *Food Chemistry*, 272, 494–506. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.07.205>

Pan-utai, W., Boonpok, S., & Pornpukdeewattana, S. (2021). Combination of mechanical and chemical extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* and its properties of microencapsulation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 33, 101979. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2021.101979>

Pan, L., Wang, H., & Gu, K. (2018). Nanoliposomes as Vehicles for Astaxanthin: Characterization, In Vitro Release Evaluation and Structure. *Molecules*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23112822>

Parra-Huertas, R.A. (2010). Revisión: microencapsulación de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(2), 5669-5684. ISSN 0304-2847.

Patel, S. M., & Pikal, M. J. (2013). Lyophilization Process Design Space. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 3883-3887. <https://doi.org/10.1002/JPS.23703>

Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 77, 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2017.03.219>

Pena Pereira, F. y Tobiszewski, M. (2017). *The Application of Green Solvents in Separation Processes*. <https://www.elsevier.com/books/the-application-of-green-solvents-in-separation-processes/pena-pereira/978-0-12-805297-6>

Peng, S., Zou, L., Zhou, W., Liu, W., Liu, C., & McClements, D. J. (2019). Encapsulation of Lipophilic Polyphenols into Nanoliposomes Using pH-Driven Method: Advantages and Disadvantages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(26), 7506-7511. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B01602>

Pereira, C. P. M., Souza, A. C. R., Vasconcelos, A. R., Prado, P. S., & Name, J. J. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory mechanisms of action of astaxanthin in cardiovascular diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 47(1), 37-48. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2020.4783>

Raaijmakers, M. J. T., & Benes, N. E. (2016). Current trends in interfacial polymerization chemistry. *Progress in Polymer Science*, 63, 86-142. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2016.06.004>

Satoh, T. (2016). Astaxanthin: Health Benefits and Toxicity. *Nutraceuticals: Efficacy, Safety and Toxicity*, 531-539. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802147-7.00038-3>

Serna-Cock, L., & Vallejo-Castillo, V. (2013). Probiotic encapsulation. *African Journal of Microbiology Research*, 7(40), 4743-4753. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.5718>

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*, 0(APR2016), 531. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00531>

Shen, X., Fang, T., Zheng, J., & Guo, M. (2019). Physicochemical Properties and Cellular Uptake of Astaxanthin-Loaded Emulsions. *Molecules*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24040727>

Shishir, M. R. I., & Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, *65*, 49-67. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.05.006>

Shu, G., Khalid, N., Chen, Z., Neves, M. A., Barrow, C. J., & Nakajima, M. (2018). Formulation and characterization of astaxanthin-enriched nanoemulsions stabilized using ginseng saponins as natural emulsifiers. *Food Chemistry*, *255*, 67-74. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.02.062>

Singh, A., & Van den Mooter, G. (2016). Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *100*, 27-50. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2015.12.010>

Sun, Z., Deng, Y., & Zhao, Y. (2019). Preparation, Optimization, and Characterization of Natural Apple Essence-Loaded Liposomes. *Journal of Food Science*, *84*(3), 540-547. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14452>

Taksima, T., Limpawattana, M., & Klaypradit, W. (2015). Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. *LWT - Food Science and Technology*, *62*(1), 431-437. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2015.01.011>

Telli, M., & Şahin, G. (2020). Effects of gradual and sudden changes of salinity and light supply for astaxanthin production in *haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Fundamental and Applied Limnology*, *194*(1), 11-17. <https://doi.org/10.1127/FAL/2020/1300>

Varona, S., Rodríguez Rojo, S., Martín, Á., Cocero, M. J., Serra, A. T., Crespo, T., & Duarte, C. M. M. (2013). Antimicrobial activity of lavandin essential oil formulations against three pathogenic food-borne bacteria. *Industrial Crops and Products*, *42*(1), 243-250. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2012.05.020>

Vinothini, K., & Rajan, M. (2019). Mechanism for the Nano-Based Drug Delivery System. Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. *Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*, 219-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814031-4.00009-X>

Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Wang, W., Pan, R., Wang, J., & Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresource Technology*, *163*, 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.017>

Wu, Y. C., Huang, H. H., Wu, Y. J., Manousakas, I., Yang, C. C., & Kuo, S. M. (2019). Therapeutic and Protective Effects of Liposomal Encapsulation of Astaxanthin in Mice with Alcoholic Liver Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16). <https://doi.org/10.3390/IJMS20164057>

Yamashita, E. (2015). Let astaxanthin be thy medicine. *PharmaNutrition*, *3*(4), 115-122. <https://doi.org/10.1016/J.PHANU.2015.09.001>

Yang, J., Hua, S., Huang, Z., Gu, Z., Cheng, L., & Hong, Y. (2021). Comparison of bioaccessibility of astaxanthin encapsulated in starch-based double emulsion with different structures. *Carbohydrate Polymers*, 272, 118475. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118475>

Zanoni, F., Vakarelova, M., & Zoccatelli, G. (2019). Development and Characterization of Astaxanthin-Containing Whey Protein-Based Nanoparticles. *Marine Drugs* 17(11), 627. <https://doi.org/10.3390/MD17110627>

Zhang, C., Liu, J., & Zhang, L. (2016). Cell cycles and proliferation patterns in *Haematococcus pluvialis*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 35(5), 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/S00343-017-6103-8>

Zhang, W.-W., Zhou, X.-F., Zhang, Y.-L., Cheng, P.-F., Ma, R., Cheng, W.-L., & Chu, H.-Q. (2018). Enhancing Astaxanthin Accumulation in *Haematococcus pluvialis* by Coupled Light Intensity and Nitrogen Starvation in Column Photobioreactors. *J. Microbiol. Biotechnol*, 28(12), 2019–2028. <https://doi.org/10.4014/jmb.1807.07008>

Zhang, X., Li, W., Dou, X., Nan, D., & He, G. (2020). Astaxanthin Encapsulated in Biodegradable Calcium Alginate Microspheres for the Treatment of Hepatocellular Carcinoma In Vitro. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 191(2), 511–527. <https://doi.org/10.1007/S12010-019-03174-Z>

Zhao, X., Liu, H., Zhang, X., Zhang, G., & Zhu, H. (2019). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* Microencapsulated by Spray Drying: Characterization and Antioxidant Activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(1), 93–102. <https://doi.org/10.1002/AOCS.12170>

Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2019). Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 42(4), 593–602. <https://doi.org/10.1007/S00449-018-02064-8>

Zhou, T., Wang, X., Ju, Y., Shi, C., & Kan, G. (2018). Stability application and research of astaxanthin integrated into food. *IOP Conf. Ser.* 394(2) <https://doi.org/10.1088/1757-899X/394/2/022007>

Ziyatdinova, G. K., & Budnikov, H. C. (2018). Spice Antioxidants as Objects of Analytical Chemistry. *Journal of Analytical Chemistry* 73(10), 946–965. <https://doi.org/10.1134/S106193481810012X>