



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“PRODUCCIÓN DE  $\beta$ -CAROTENO EN *Dunaliella* sp. BAJO DOS  
CONDICIONES ESTRESANTES”.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

ANGHELO STEVEN GONZÁLEZ PALMA

DOCENTE TUTOR:

ING. JIMMY VILLÓN MORENO, MSc.

CO-TUTOR:

BLGA. JANNETH GALARZA TIPÁN, Ph.D

LA LIBERTAD - ECUADOR

2026

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

**“PRODUCCIÓN DE  $\beta$ -CAROTENO EN *Dunaliella* sp. BAJO DOS  
CONDICIONES ESTRESANTES”.**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del título de:

BIÓLOGO

AUTOR:

ANGHELO STEVEN GONZÁLEZ PALMA

DOCENTE TUTOR:

ING. JIMMY VILLÓN MORENO, MSc.

CO-TUTOR:

BLGA. JANNETH GALARZA TIPÁN, Ph.D

LA LIBERTAD - ECUADOR

2026

## DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, "**Producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp. bajo dos condiciones estresantes**" elaborado por **Anghelo Steven González Palma**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



---

Ing. Jimmy Agustín Villón Moreno, MSc

**DOCENTE TUTOR**

**C.I 0913270153**

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA**

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “PRODUCCIÓN DE  $\beta$ -CAROTENO EN *Dunaliella* sp. BAJO DOS CONDICIONES ESTRESANTES”, elaborado por GONZÁLEZ PALMA ANGHELO STEVEN, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



---

**Blga. Ángela Reyes Lainez, Mgt.**

**DOCENTE DE ÁREA**

**C.I. 0913401014**

## **DEDICATORIA**

A Dios, por ser mi guía de vida, por ayudarme a no desviarme del camino, por darme las fuerzas necesarias para poder culminar con éxito esta etapa académica que no fue fácil; y por cada una de las bendiciones que me brinda.

A mis padres, Richard González y Cirita Palma por ser mi fuente de inspiración y los pilares que me sostienen, porque el esfuerzo que realizan día a día como padres me han enseñado grandes valores, como el trabajo honesto, la humildad, la bondad y el amor. A mi abuela, Andrea Valverde que es mi primera madre, por cada uno de sus consejos de vida que me han ido construyendo a lo largo de los años, por darme ánimos y enseñarme que los grandes objetivos conllevan sacrificios.

A mis hermanos, por ser mis compañeros de vida y por la felicidad que me regalan, su compañía me hace darme cuenta que nunca estaré solo porque ustedes son mis mejores amigos.

## AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena y docentes de la facultad de Ciencias del Mar, que me han brindado sus conocimientos en las diferentes áreas de la biología y enseñarme a valorar más esta hermosa carrera.

A la Dra. Janeth Galarza Tipán, por ser mi mentora, sus conocimientos y experiencias me han ayudado a fortalecerme como profesional, por brindarme su confianza y ayudarme a desarrollar este trabajo con éxito.

Al Ing. Jimmy Villón Moreno, por ser mi tutor de tesis, su orientación me ha permitido finalizar este trabajo de manera satisfactoria.

A la blga. Sara Ríos por brindarme sus conocimientos en la ficología, su paciencia y su carisma me han sido de mucha ayuda para desenvolverme en esta área.

A la Universidad Estatal de Bolívar, por brindarme sus instalaciones para desarrollar los análisis que se requerían; así mismo, agradezco a la Ing. María Fernanda Quinteros por orientarme y enseñarme a realizar análisis en HPLC que me han permitido fortalecer mis conocimientos.

A la Blga. Laura Reyes y mis compañeros de laboratorio, que juntos enfrentamos muchos desafíos, los cuales nos han dejado experiencias que sé nos servirán en nuestra vida profesional para enfrentar los obstáculos que se presenten.

## TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **González Palma Anghelo Steven** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 12 de diciembre de 2025



---

Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.  
DIRECTOR DE CARRERA  
PRESIDENTE DE TRIBUNAL



---

Blga. Ángela Reyes Lainez, Mgt.  
DOCENTE DE ÁREA  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



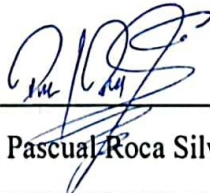
---

Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.  
DOCENTE TUTOR  
MIEMBRO DE TRIBUNAL



---

Blgo. Richard Duque Marín, Mgt.  
DOCENTE GUÍA DE UIC II  
MIEMBRO DEL TRIBUNAL




---

Lcdo. Pascual Roca Silvestre, Mgt.  
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

## DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, Anghelo Steven González Palma, declaro que la responsabilidad por las ideas, contenido y análisis de los resultados expuestos en este trabajo de Integración Curricular pertenecen exclusivamente al autor, el patrimonio intelectual del mismo le corresponde a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

  
Anghelo Steven González Palma  
C.I: 2450500471

## CONTENIDO

RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	6
CAPITULO I.....	8
1. OBJETIVOS .....	8
1.1. Objetivo general.....	8
1.2. Objetivos específicos .....	8
HIPÓTESIS.....	8
CAPÍTULO II .....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Importancia de las microalgas.....	9
2.2. Género Dunaliella .....	10
2.2.1. Generalidades.....	10
2.2.2. Morfología y fisiología de Dunaliella .....	11
2.2.3. Taxonomía.....	12
2.2.4. Propiedades bioquímicas de Dunaliella .....	13
2.3. Factores físicos-químicos para el cultivo de Dunaliella .....	14
2.3.1. Requerimientos nutricionales.....	14

2.3.2.	Luz.....	15
2.3.3.	Temperatura.....	16
2.3.4.	pH.....	16
2.3.5.	Salinidad.....	16
2.4.	Organismos productores de carotenoides.....	17
2.4.1.	Clasificación de carotenoides.....	18
2.4.2.	$\beta$ -caroteno.....	19
2.4.3.	Ruta biosintética de carotenoides.....	20
2.5.	Determinación de carotenoides totales por espectrofotometría .....	22
2.6.	Determinación de $\beta$ -caroteno mediante HPLC .....	23
2.7.	Medios de cultivos empleados para <i>Dunaliella</i> .....	24
2.7.1.	Medio de cultivo Guillard's F/2.....	24
CAPÍTULO III.....		26
3.	MARCO METODOLÓGICO .....	26
3.1.	Materiales y métodos .....	26
3.2.	Tipo de investigación .....	26
3.3.	Cultivo vegetativo .....	27
3.3.1.	Mantenimiento de cepa .....	27
3.3.2.	Escalamiento de cultivo vegetativo.....	28
3.3.3.	Densidad Celular y Tasa de Crecimiento .....	30

3.3.4.	Concentración y productividad de biomasa .....	31
3.4.	Inducción a carotenogénesis .....	32
3.4.1.	Condiciones de estrés .....	32
3.4.2.	Conversión de lux a $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . .....	34
3.4.3.	Respuesta a estrés.....	34
3.4.4.	Cosecha de biomasa. ....	35
3.4.5.	Extracción de carotenos. ....	35
3.4.6.	Método analítico.....	36
3.5.	ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO. ....	37
3.5.1.	Lugar de estudio.....	37
3.5.2.	Extracción de pigmentos. ....	37
3.5.3.	Detección de $\beta$ -caroteno mediante HPLC.....	38
3.5.4.	Análisis de datos. ....	39
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	40
CAPÍTULO IV.....		41
4.	RESULTADOS .....	41
4.1.	Densidad celular.....	41
4.1.1.	Tasa de crecimiento y productividad de biomasa.....	42
4.1.1.1.	Tasa de crecimiento.....	42
4.1.1.2.	Productividad de Biomasa.....	42

4.2.	Inducción a carotenogénesis .....	43
4.2.1.	Densidad celular en respuestas a estrés por intensidad lumínica y deficiencia de N.....	43
4.2.2.	Morfología como respuesta ante estrés por intensidad lumínica y deficiencia de nitrógeno.....	45
4.2.3.	Análisis de metabolitos mediante espectrofotometría.....	47
4.2.3.1.	Clorofila a.....	47
4.2.3.2.	Clorofila b .....	49
4.2.3.3.	Carotenoides totales .....	50
4.3.	Análisis de $\beta$ -caroteno en <i>Dunaliella</i> sp. mediante HPLC.....	52
	DISCUSIONES.....	54
	CONCLUSIONES .....	63
	RECOMENDACIONES .....	65
	BIBLIOGRAFÍA.....	66
	ANEXOS.....	83

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

**Figura 1.** Cambio morfológico y reproducción asexual. (a) Célula vegetativa. (b) Crecimiento del diámetro celular y adaptación a la forma esférica. (c, d) Aparición

de cuatro flagelos y división de la célula madre. (e, f) Célula vegetativa con coloración naranja.....	12
<b>Figura 2.</b> Estructura de $\beta$ -caroteno.....	20
<b>Figura 3.</b> Vía metabólica de producción de carotenoides en <i>Dunaliella</i> .....	22
<b>Figura 4.</b> Grupos experimentales: T1 (500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y deficiencia de nitrógeno); T2 (800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y deficiencia de nitrógeno); TC (Control, condiciones vegetativas pero con deficiencia de nitrógeno); TV (Cultivos vegetativos).....	29
<b>Figura 5.</b> Grupos experimentales de estrés .....	33
<b>Figura 6.</b> Cromatograma y curva de calibración de $\beta$ -caroteno estándar.....	39
<b>Figura 7.</b> Curva de crecimiento de <i>Dunaliella sp.</i> .....	42
<b>Figura 8.</b> Densidades celulares de <i>Dunaliella sp.</i> en cultivos de estrés; T1 (500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con deficiencia de N); T2 (800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con deficiencia de N); TC (50 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con deficiencia de N).....	43
<b>Figura 9.</b> Cambios morfológicos de <i>Dunaliella sp.</i> sometidas a estrés 1 con 500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con deficiencia de N.....	45
<b>Figura 10.</b> Cambios morfológicos de <i>Dunaliella sp.</i> sometidas a estrés 2 con 800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ con deficiencia de N. ....	46
<b>Figura 11.</b> Concentraciones de Clorofila a entre grupos experimentales de <i>Dunaliella sp.</i> .....	47
<b>Figura 12.</b> Concentraciones de clorofila b en grupos experimentales de <i>Dunaliella sp.</i> .....	49
<b>Figura 13.</b> Producción de carotenoides totales por grupos en <i>Dunaliella sp.</i> .....	50

<b>Figura 14.</b> Concentraciones de $\beta$ -caroteno en <i>Dunaliella</i> sp. ....	52
--	----

## ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Cultivos iniciales de 300 mL.....	83
<b>Anexo 2.</b> Día 0 de estrés, izquierda grupo T1, Derecha grupo T2.....	83
<b>Anexo 3.</b> Cosecha de biomasa. ....	84
<b>Anexo 4.</b> Día 7 de estrés del grupo T2 "800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y -N".....	84
<b>Anexo 5.</b> Extracción de carotenoides con Metanol. ....	85
<b>Anexo 6.</b> Control de parámetros físicos.....	85
<b>Anexo 7.</b> Extracción y preparación de muestras para análisis en HPLC.....	86
<b>Anexo 8.</b> Cromatografía Líquida de Alta Resolución "HPLC". ....	86
<b>Anexo 9.</b> Estadística de curva de crecimiento. ....	87
<b>Anexo 10.</b> Estadística de carotenoides.....	87
<b>Anexo 11.</b> Estadística de Clorofila a.....	88
<b>Anexo 12.</b> Estadística de Clorofila b. ....	88
<b>Anexo 13.</b> Estadística de $\beta$ -caroteno.....	89
<b>Anexo 14.</b> Cromatograma y curva de calibración de $\beta$ -caroteno. ....	89
<b>Anexo 15.</b> Cromatograma $\beta$ -caroteno T1 "500 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y -N".....	90
<b>Anexo 16.</b> Cromatograma $\beta$ -caroteno T2 "800 $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y -N".....	90
<b>Anexo 17.</b> Cromatograma $\beta$ -caroteno Control "TC". ....	90
<b>Anexo 18.</b> Cromatograma $\beta$ -caroteno vegetativo "TV". ....	90

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Soluciones del Medio de cultivo Guillard F/2.....	25
<b>Tabla 2.</b> Parametros de cultivos.....	28

## GLOSARIO

**Carotenoides:** Son pigmentos sintetizados por plantas, hongos, y microorganismos como microalgas, bacterias, levaduras; con gran capacidad antioxidante. Generalmente son de color amarillo, naranja y rojo.

**β-caroteno:** Es un metabolito secundario específico dentro del grupo de los carotenoides cíclicos, conocido por su capacidad antioxidante y por ser precursor de la vitamina A.

**Microorganismos:** organismos diminutos o sistemas biológicos de micro tamaño que solo pueden ser observados mediante microscopios.

**Carotenogénesis:** Proceso bioquímico por el cual diversos organismos como plantas, microalgas, bacterias, hongos y levaduras sintetizan carotenoides.

**Clorofila:** Pigmentos fotosintéticos producidos en los cloroplastos de plantas superiores e inferiores como algas.

**Estrés:** respuestas fisiológicas y bioquímicas de las células de microorganismos antes condiciones de cultivos extremas o dañinas para su crecimiento.

**Bioprospección:** es el proceso de búsqueda sistemática y exploración de organismos, con la finalidad de encontrar compuestos, genes o información bioquímica que tengan potencial para su aplicabilidad.

**Medio:** soluciones químicas diseñadas exclusivamente para imitar un ambiente natural donde las microalgas crezcan, satisfaciendo sus requerimientos nutricionales.

## ABREVIATURAS

TV: Tratamiento vegetativo

TC: Tratamiento control

T1: Tratamiento 1

T2: Tratamiento 2

µg: microgramo

mL: Mililitro

mg: miligramo

gr: gramo

µmol: micro mol

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

PPT: partes por mil

L: litro

$\beta$ : beta

$\mu$ : tasa de crecimiento

N: nitrógeno

P: fósforo

RPM: revoluciones por minuto

RCF: fuerza centrífuga relativa

Min: minutos

ln: logaritmo natural

nm: nanómetros

cell: células

kg: kilogramos

Ca: clorofila a

Cb: clorofila b

-N: deficiencia de nitrógeno

TR: tiempo de retención

## RESUMEN

El género *Dunaliella* corresponde a un grupo de microalgas clorofíceas con importancia en la producción de compuestos bioactivos como carotenoides, en especial  $\beta$ -caroteno que es conocida por ser precursora de la vitamina A y por su actividad antioxidante, la cual es producida en mayor medida por *D. salina*. Por ello, se propone evaluar a *Dunaliella* sp., una cepa silvestre aislada de pozos de Ecuasal de Salinas - Santa Elena, en dos condiciones de cultivo de estrés lumínico junto a la deficiencia de nitrógeno T1 “500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N”, T2 “800  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N”, frente a un grupo control TC “50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N” y un grupo vegetativo TV “50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y nutrientes completos”, para evidenciar si la cepa es o no carotenogénica en condiciones extremas de estrés. Dentro de los resultados obtenidos, las células alcanzaron su fase logarítmica exponencial en 9 días con una densidad celular de  $1.8 * 10^6$  cell/mL, una tasa de crecimiento de  $0.36 d^{-1}$  y una productividad de  $0.035 g L^{-1}d^{-1}$ . Con respecto al contenido de pigmentos, los cultivos del grupo control presentaron los mejores resultados de carotenoides totales, con una concentración de  $9.58 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ . Mientras que los cultivos vegetativos mostraron mayor eficiencia en la producción de clorofila a y clorofila b, con concentraciones de  $2.95 \pm 0.013 \mu\text{g/mL}$  y  $2.28 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$  respectivamente. En los análisis de  $\beta$ -caroteno, el grupo con una mayor concentración de este metabolito fue el grupo control con una concentración de  $41.15 \pm 0.08 \text{ mg/gr}$ .

**Palabras claves:** Carotenoides,  $\beta$ -caroteno, deficiencia, estrés.

## ABSTRACT

The genus *Dunaliella* corresponds to a group of chlorophytic microalgae that are important in the production of bioactive compounds such as carotenoids, especially  $\beta$ -carotene, which is known to be a precursor of vitamin A and for its antioxidant activity, which is produced to a greater extent by *D. salina*. Therefore, we propose to evaluate *Dunaliella* sp., a wild strain isolated from wells in Ecuasal of Salinas - Santa Elena, under two light stress culture conditions together with nitrogen deficiency T1 “500  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and -N”, T2 “800  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and -N”, compared to a control group TC “50  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and -N” and a vegetative group TV “50  $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$  and complete nutrients”, to show whether or not the strain is carotenogenic under extreme stress conditions. Among the results obtained, the cells reached their exponential logarithmic phase in 9 days with a cell density of  $1.8 \times 10^6$  cells/mL, a growth rate of  $0.36 \text{ d}^{-1}$ , and a productivity of  $0.035 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . With regard to pigment content, the control group cultures showed the best results for total carotenoids, with a concentration of  $9.58 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ . Meanwhile, vegetative cultures showed greater efficiency in the production of chlorophyll a and chlorophyll b, with concentrations of  $2.95 \pm 0.013 \mu\text{g/mL}$  and  $2.28 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ , respectively. In the  $\beta$ -carotene analyses, the group with the highest concentration of this metabolite was the control group, with a concentration of  $41.15 \pm 0.08 \text{ mg/g}$ .

Keywords: Carotenoids,  $\beta$ -carotene, deficiency, stress.

## INTRODUCCIÓN

Las microalgas son un grupo diversificado de microorganismos unicelulares, que a través de su proceso evolutivo han logrado adaptarse a diferentes hábitats, como ambientes salinos, dulceacuícolas, aguas residuales e inclusive en suelos (Yan et al., 2013; Guamán, 2019). Sintetizan metabolitos de interés biotecnológico como carotenoides, clorofilas, polisacáridos, lípidos, proteínas, entre otros (Vela-García et al., 2019). Por ello en las últimas cuatro décadas, la bioprospección de microalgas se ha incrementado de forma significativa, debido al potencial que presentan las microalgas para su aplicabilidad dentro de las diversas industrias y por la demanda de productos sintetizados de manera natural (Vigani et al, 2015; García et al., 2017).

Uno de los biocompuestos más importantes sintetizados por microalgas son los carotenoides, los cuales son pigmentos que las protegen ante el estrés oxidativo causado por alteraciones físico-químicas en el medio (Zafar et al., 2021; Saubenova et al., 2024). Dentro de los carotenoides, el  $\beta$ -caroteno es uno de los más importante y estudiados, por su actividad como precursor de la vitamina A, antioxidante, además, que actúa como una prehormona que al ser ingerido se convierte en ácido retinoico, actuando como ligando en la regulación de la expresión de genes en procesos metabólicos (Ross et al., 2001; Graziano, 2014; Zulfiqar et al., 2021). Entre las principales microalgas cultivadas para producción de carotenoides, encontramos a: *D. salina*, *H. pluvialis* y *B. braunii* (Raita et al., 2023).

El género *Dunaliella* ha sido descrito como un grupo importante dentro de las microalgas productoras de carotenoides; dentro de este género, las especies *D. salina* y *D. bardawil* serían de las especies que más carotenoides producen (Ye et al., 2008). De los cuales, el más común de estos carotenoides es el  $\beta$ -caroteno, llegando a alcanzar concentraciones de entre el 10% y 15% de su biomasa seca; entre otros carotenoides que podemos encontrar en células de *Dunaliella* están el  $\alpha$ -caroteno, zeaxantina, luteína, neoxantina y criptoxantina (Oren, 2005; Barbosa et al., 2023); por otra parte, especies como *D. parva* y *D. tertiolecta* acumulan alrededor del 9% de  $\beta$ - caroteno de su masa seca, mientras que *D. viridis* acumula 0,07% de  $\beta$  caroteno y carotenoides mixtos (Moslemipetroudi et al., 2020).

El mercado global aún está dominado por carotenoides sintéticos (Saubenova et al., 2024b). Sin embargo, el  $\beta$ -caroteno sintético está conformado específicamente de isómeros todo-trans, y se obtienen mediante la síntesis química con la reacción de Wittig y a partir de compuestos de Grignard; diversos estudios indican que  $\beta$  caroteno sintético podría tener efectos secundarios serios (Kevin et al., 2022a.; Álvarez et al, 2014); mientras que el  $\beta$ -caroteno natural está conformado por isómeros 9-cis, todo-trans, 15-cis y otros isómeros que presentan beneficios de mayor relevancia, además de que son más solubles en grasa que el sintético (Shaish et al. 2006; Bogacz et al., 2018; Combe et al.2015). Entre los métodos de extracción de  $\beta$ -caroteno natural, es mediante plantas y frutas, lo cual está dejando de ser utilizada por los costos elevados que conllevan su extracción (Bogacz et al., 2018). Por ello se han desarrollado nuevos métodos ecológicos y rentables, a través de la

biosíntesis microbiónica por microorganismos como las microalgas (Wongsansilp et al., 2019). Debido a esto, para maximizar la producci3n de componentes de alto valor biotecnol3gicos en *Dunaliella*, deben desarrollarse nuevos sistemas y procesos que promuevan la sntesis de metabolitos de mayor calidad (Chew et al., 2017).

A nivel local y nacional, no se ha difundido suficiente informaci3n en investigaciones con la microalga *Dunaliella*, y en las que se han realizado, han evaluado contenido de carotenoides totales, solo una investigaci3n evalu3 niveles de  $\beta$ -caroteno y capacidad antioxidante de un aceite de soya enriquecido con *D. salina*; sin embargo, se trabaj3 con una cepa ya identificada y siguiendo un protocolo ya establecido (Guevara et al., 2019). Por lo que, este trabajo sería el primero en realizar un análisis especíico de  $\beta$ -caroteno en una cepa silvestre, evaluando dos condiciones de estr3s por alta intensidad lumínica de 500 y 800  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$  ambas con deficiencia de nitr3geno.

Para que las microalgas *Dunaliella* sinteticen altos contenidos de  $\beta$ -caroteno, las células deben someterse a condiciones de crecimiento que de manera general reduzcan las tasas de crecimiento e induzcan a un proceso de carotenog3nesis, como altas intensidades de luz, temperaturas extremas, altas salinidades y nitr3geno limitado (Lamers et al., 2008). Por ello, para tener una mayor eficiencia en los cultivos tanto de biomasa como para producci3n de  $\beta$ -caroteno, Qin et al. (2021)

recomienda realizar cultivos en dos fases, la primera fase consiste en la producción de biomasa mediante cultivos con bajas irradiaciones de luz  $50\text{-}60 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , nutrientes completos, salinidad normal 35 ppt y temperaturas  $20 - 27^\circ\text{C}$ ; cabe mencionar que estos parámetros varían según las especies y condiciones ambientales. Entre los principales medios de cultivos para *Dunaliella* podemos encontrar, medio Johnson modificado (Borowitzka et al., 1988), medio F/2 de Guillard (Guillard et al., 1962), medio APS modificado (Mclachlan et al., 1959), medio de agua de mar enriquecido con *Parvasoli* (PES), y medios artificiales (ART) (Mclachlan, 1973; BenAmotz et al., 1988), usados para producción de biomasa.

Investigaciones previas han demostrado la eficiencia de *Dunaliella* a diferentes regímenes de luz relativamente altos y concentraciones de nitrógeno bajos para la producción de  $\beta$ -carotenos. Nguyen (2016) evaluó tres cepas de *Dunaliella*, dos de *D. salina* y una de *D. bardawil* a intensidades de  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con combinaciones de fotoperiodos, *D. salina* CCAP demostró mejor adaptación y mejores concentraciones de carotenoides por  $\mu\text{g/mL}$  y  $\text{pg/célula}$ , mientras que *D. bardawil* tuvo una mayor concentración de carotenoides/clorofila, ambas a una intensidad lumínica constante de  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Por otro lado, Sui et al. (2019) en su investigación recomiendan abordar en cultivo en dos fases, la primera debe ser un cultivo rico en nitrógeno para el crecimiento de biomasa, mientras que, en la segunda fase se debe someter a un cultivo deficiente de nitrógeno acompañado por una intensidad de luz alta para una buena producción de  $\beta$ -caroteno y proteína, alcanzando una concentración de

carotenoides de 4 mg/L/d. Kevin et al. (2022b) evaluaron la influencia de la radiación UV junto con la deficiencia de nitrógeno (0.03 mg/L) en la producción de  $\beta$ -caroteno, en la que se realizaron prueba con los parámetros de luz y concentraciones de N por separado y una unificación de ambos parámetros, la prueba con la unificación de los parámetros permitió obtener una alta concentración de este metabolito 0,491%. Por otra parte, Wu et al. (2015) nos indica que la concentración de nitratos fue la que más influyo en la concentración de  $\beta$ -caroteno a comparación de la intensidad de luz, en la que la prueba con mayor concentración de nitratos resulto con una mayor concentración celular y una alta concentración de  $\beta$ -caroteno. Estas investigaciones nos dan la teoría de que para la producción de carotenoides y  $\beta$ -caroteno dependerá en gran medida de las adaptaciones que las cepas tengas a niveles fisiológicos y morfológicos de las condiciones de estrés que se someten.

En base a lo anterior, la presente investigación pretende evaluar como las intensidades lumínicas acompañadas con deficiencia de nitrógeno afectan o benefician en la producción de  $\beta$ -caroteno en la cepa de *Dunaliella* sp. aislada en la provincia de Santa Elena.

## JUSTIFICACIÓN

El  $\beta$ -caroteno es uno de los carotenoides de mayor interés biotecnológico e industrial por sus propiedades como antioxidante y precursor de la vitamina A, sin embargo, los métodos tradicionales de producción de  $\beta$ -caroteno presentan limitaciones; la obtención mediante fuentes naturales a partir de plantas superiores, conllevan costos elevados. Por otro lado, los métodos de síntesis química, han generado preocupación, ya que estudios sugieren que estos productos presentan efectos secundarios graves. Estas razones, han incentivado a desarrollar métodos de producción más sostenibles de estos metabolitos, lo cual se ha logrado mediante biosíntesis microbológicas, a través de microorganismos como, microalgas, bacterias, hongos y levaduras.

El género *Dunaliella* destaca de entre los demás microorganismos que sintetizan  $\beta$ -caroteno, ya que, bajo condiciones de estrés como alta intensidad lumínica, alta salinidad, alta temperatura, deficiencia de nitrógeno, entre otras variables físico-químicas, estimulan la síntesis de carotenoides en especial  $\beta$ -caroteno como método de protección ante los factores ambientales, tanto así que la bibliografía indica que la especie *D. salina* alcanza concentraciones de este metabolito alrededor del 10% y 15% de su peso seco.

El presente estudio que consiste en evaluar dos condiciones estresantes en *Dunaliella* sp. para producción de  $\beta$ -caroteno, las cuales están conformadas de dos

intensidades lumínicas acompañadas con deficiencia de nitrógeno cada una, será de gran importancia, debido a que muchos investigadores abordan de manera independiente las condiciones de estrés, y aunque existan investigaciones que combinan variables, todavía existe la necesidad de investigar condiciones con nuevos parámetros físicos-químicos para producción de metabolitos de interés biotecnológico, más aún con cepas silvestres, aisladas en las comunidades locales, ayudando a evaluar si dichas cepas tienen potencial o no para su explotación industrial y científica.

Es importante conocer que a nivel nacional la información sobre cultivos de *Dunaliella* es muy limitante, lo que conlleva a que el conocimiento e investigaciones sobre esta microalga sea nula, impidiendo inclusive que el sector industrial nacional se interese en esta microalga que a nivel internacional es ampliamente investigada y aplicada. La única universidad que ha realizado investigaciones en *Dunaliella* aislada de un medio silvestre es la Universidad Estatal Península de Santa Elena, sin embargo, se han realizado análisis generales de carotenoides, la presente investigación propone realizar un análisis específico de  $\beta$ -caroteno bajo ciertas condiciones de estrés, fortaleciendo así a la investigación local como nacional.

## CAPITULO I

### 1. OBJETIVOS

#### 1.1. Objetivo general

Evaluar la producción de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp. bajo condiciones de estrés por alta intensidad lumínica y deficiencia de nitrógeno, determinando en qué condición se produce una mayor concentración de este metabolito secundario.

#### 1.2. Objetivos específicos

- Calcular la productividad celular de *Dunaliella* sp. en medio Guillard F2, para la evaluación de su crecimiento en cultivos vegetativos.
- Establecer las condiciones de estrés por alta intensidad lumínica y deficiencia de nitrógeno, que induzcan a una mayor concentración de carotenoides.
- Determinar la concentración de  $\beta$ -caroteno producida por *Dunaliella* sp., mediante análisis por cromatografía líquida de Alta Resolución, HPLC.

## HIPÓTESIS

- $H_0$ : La concentración de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp. no estará influenciada por las altas intensidades lumínicas acompañadas con deficiencia de nitrógeno.

## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. Importancia de las microalgas**

Las algas en general son un grupo diversificado de organismos fotosintéticos simples caracterizados de forma general por su tamaño, forma, color o hábito de crecimiento, lo cual lo realizan exclusivamente en entornos acuáticos en su mayoría que van desde agua dulce, estuarios y océanos, aunque existen ciertas especies que pueden encontrarse en el suelo o en las rocas, también habitan en zonas húmedas o incluso relativamente secas (Leite et al., 2012). Si bien es cierto, las macro y microalgas cumplen un rol importante en los ecosistemas donde habitan, ya que funcionan como productores primarios dentro de la cadena trófica, produciendo materia orgánica (biomasa) a partir de la luz solar donde realizan fotosíntesis y fabrican sus alimentos, además de la captación de dióxido de carbono y nutrientes presentes en el medio (Sluiman, 2009; Amante et al., 2009).

Las microalgas han despertado un gran interés en las diferentes industrias como importante recurso biológico, debido a sus múltiples aplicaciones, este interés se debe a los productos derivados de las mismas se utilizan ampliamente en las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria, en el área de la ecología, etc (Souza et al., 2012; Boual et al., 2018).

El cultivo de microalgas ha mostrado un auge en las últimas décadas, ya que uno de los principales objetivos a parte de producir biomasa, es que son cultivados también para la producción de metabolitos de gran interés industrial y biotecnológico; por ello microalgas de los géneros *Botryococcus*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Spirulina*, han despertado interés en la biotecnología microalgal para producir bioproductos como, proteínas, astaxantina, polisacáridos, vitaminas, minerales, esteroides,  $\beta$ -caroteno, glicerol, productos químicos finos y otros compuestos biológicamente activos (Raja et al. 2007, Wijffels et al. 2013).

## **2.2. Género *Dunaliella***

### **2.2.1. Generalidades**

Las células de *Dunaliella* fueron identificadas por primera vez por Michel F. Dunal (Dunal, 1838) en salinas del sur de Francia y descritas como algas unicelulares rojizas. En 1905, Emanoil C. Teodoresco propuso el género (Teodoresco, 1905); desde entonces se han logrado identificar 28 especies que habitan en diferentes hábitats, que van desde aguas dulces y marinas hasta ambientes hipersalinos. Estas especies presentan un gran potencial para la biotecnología y se les otorga un gran valor económico. Un ejemplo es la especie *D. salina*, que en 1966 fue propuesta como recurso natural para la obtención de  $\beta$ -carotenoides, ya para el año de 1980 fue declarada como fuente de producción de glicerol (Reshma et al., 2021).

Durante los últimos años se han realizado reevaluaciones del género, catalogándose 29 especies, de las cuales 17 son halófilas: *D. parva*, *D. salina*, *D. pseudosalina*, *D. ruineniana*, *D. gracilis*, *D. bioculata*, *D. carpatica*, *D. granulata*, *D. baasbeckingii*, *D. minuta*, *D. media*, *D. minutissima*, *D. terricola*, *D. viridis*, *D. ametrica*, *D. peircei* y *D. turcomanica*. De las cuales las especies más investigadas hasta la actualidad son *D. salina*, *D. tertiolecta*, *D. primolecta*, *D. viridis*, *D. bioculata*, *D. acidophila*, *D. parva* y *D. media* (Borowitzka et al., 2007).

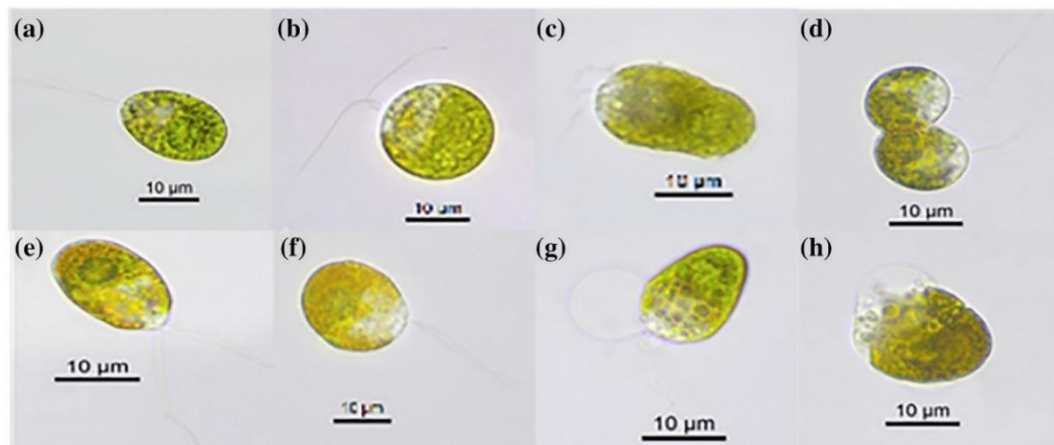
El género *Dunaliella* presenta 2 formas de reproducción, se multiplican por división longitudinal y en ciertas ocasiones puede ocurrir reproducción sexual por isogamia, en este proceso dos células se fusionan, formando un cigoto (Oren, 2005). También se ha demostrado que estas células pueden conducir a la formación de células palmelloides o aplanosporas, si las condiciones ambientales inhiben el crecimiento (Barbosa et al., 2023).

### **2.2.2. Morfología y fisiología de *Dunaliella***

La morfología de células en estado vegetativo, son biflageladas una característica general, presentan diferentes formas según la especie, que van de ovoides, esféricas, piriformes, fusiformes o elipsoidales, con tamaños que pueden variar entre 5 a 25  $\mu\text{m}$  de longitud y 3 a 13  $\mu\text{m}$  de ancho (Tafreshi et al., 2009). Las células contienen un único cloroplasto central en forma de copa con un piranoide central rodeado de granos de almidón (Borowitzka et al., 2007).

Presentan ausencia de una pared celular rígida y a su vez presentan una membrana celular delgada y elástica, lo que les permite tener una adaptación morfológica más efectiva, según las variaciones de presión osmótica del ambiente externo (Da Silva et al., 2021). Cuando un cultivo de *Dunaliella* es sometido a condiciones de estrés, existen cambios notorios en las mismas; por ejemplo, en un estudio ejecutado por Acevedo et al. (2021), se observaron que células de *D. salina*, cambiaron de una coloración verde a naranja en cultivos con niveles altos de salinidad, se presentó un proceso de división celular después de que las células hayan cambiado su forma normal a esférica, lo cual es muy raro; también se presentó desplazamiento de la membrana celular (Figura 1).

**Figura 1.** Cambio morfológico y reproducción asexual. (a) Célula vegetativa. (b) Crecimiento del diámetro celular y adaptación a la forma esférica. (c, d) Aparición de cuatro flagelos y división de la célula madre. (e, f) Célula vegetativa con coloración naranja.



Nota: Fuente (Acevedo et al., 2021)

### 2.2.3. Taxonomía

Dominio: Eukarya

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Volvocales

Familia: Dunaliellaceae

Género: *Dunaliella* (Teodoresco, 1905; González et al., 2019)

#### **2.2.4. Propiedades bioquímicas de *Dunaliella***

Las diferentes especies del género *Dunaliella* son reconocidas por su capacidad de sintetizar de manera natural bioproductos como carotenoides, lípidos y glicerol. Por ejemplo, especies como *D. salina* y *D. bardawil*, son las cepas con una capacidad única de sintetizar altas concentraciones de carotenoides, de los cuales el carotenoide más común que se puede encontrar en estas especies es el  $\beta$ -caroteno, que a nivel biotecnológico podría considerarse el de mayor interés, por sus múltiples beneficios; aunque también se pueden encontrar carotenoides como  $\alpha$ -caroteno, luteína, zeaxantina, criptoxantina y neoxantina (Tafreshi et al., 2009).

Son también una fuente importante en la producción de lípidos, ya que se sabe que ciertas especies pueden llegar a almacenar hasta un 25% de su masa seca de lípidos; la síntesis de lípidos en *Dunaliella* al igual que los carotenoides se ven influenciados por ciertos factores de crecimiento que generen estrés y como método de

supervivencia, estos microorganismos sintetizan dichos metabolitos de interés comercial (Benhima et al., 2018); Además, son usadas para producción de glicerol, debido a que en ambientes o condiciones de cultivos hipersalinos, sintetizan glicerol para mantener protegidos su membrana y contenido de proteínas, ciertas especies pueden almacenar hasta un 50% de su masa seca (Chow et al., 2013) .

### **2.3.Factores físicos-químicos para el cultivo de Dunaliella**

Dunaliella son microorganismos que tiene la ventaja de poder prosperar en ambientes que para otras microalgas podrían ser imposibles, por ejemplo, crecen en hábitats con altas concentraciones de NaCl, lo que facilita su cultivo tanto en estanques abiertos como en biorreactores cerrados. Sin embargo, existen varios factores que influyen en un sistema de cultivo para Dunaliella, como disponibilidad de nutrientes, temperaturas, pH, luz, etc; se sabe que, si se alteran estos factores, influyen drásticamente en su morfología y fisiología, los cuales se describen a continuación:

#### **2.3.1. Requerimientos nutricionales**

Debido a que Dunaliella son microalgas fotoautótrofas, es decir dependen de la luz y dióxido de carbono o bicarbonato como única fuente de carbono inorgánico, para la obtención de sus alimentos, la ausencia de la fuente de carbono limita drásticamente el crecimiento de estos microorganismos (Tafreshi et al., 2009).

La principal fuente de nitrógeno para estas microalgas son los nitratos, de los cuales los más implementados en cultivos son  $\text{NaNO}_3$  o  $\text{KNO}_3$  para tener crecimientos favorables; es importante saber que la limitación de una fuente de nitrógeno reduce la tasa de crecimiento y a su vez induce a un proceso de carotenogénesis. Entre las principales fuentes de fósforo, son las que encontramos en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  o  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , los cuales son las más recomendadas, si se exceden en las fuentes de fósforo recomendadas pone en riesgo en cultivo, ya que reduce el crecimiento e inclusive pueden llegar a la floculación de la biomasa suspendida. Existen otros elementos que ayudan al crecimiento vegetativo de estas microalgas, pero las mencionadas podrían considerarse las más importantes (Borowitzka et al., 1987).

### **2.3.2. Luz**

Como se mencionó anteriormente, *Dunaliella* es una microalga fotoautótrofa, necesita luz solar para poder vivir; por ello cuando se realizan cultivos en estanques abiertos, su única fuente de luz es la luz solar; por el contrario, cuando se trabaja en biorreactores o sistemas cerrados se hacen uso de lámparas fluorescentes blancas. Es importante conocer que para el crecimiento vegetativo y para la síntesis de carotenoides son procesos que responden de manera diferentes a las diversas fuentes de luz, como pueden ser color de luz o diferentes rangos de luz, que por lo general son intensidades altas (Gómez et al., 2005). Para cultivo vegetativo, se usan rangos de luz a partir de  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$  hasta  $150 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **2.3.3. Temperatura**

Dunaliella tiene especies que toleran un amplio rango de temperaturas, tanto así que tiene una especie que puede crecer en ambientes con temperatura bajo cero, como es el caso de *D. antártica* (Wright et al., 1981). Y los rangos máximos de temperatura son de 45°C, por ello, se sabe que la temperatura para que la mayoría de especies de este género crezcan están entre 25 y 35°C según los tipos de cultivos, ya sean cerrados o abiertos, los rangos mayores de temperatura inducen a la producción de carotenoides por estrés, disminuyendo el crecimiento celular y provocando inclusive contaminación, ya que estos microorganismos al estar en temperaturas elevadas causan una fuga de glicerol, la cual se considera una fuente de carbono orgánico para bacterias y hongos filamentosos (Wegmann et al., 1980; Ben-Amotz, 1995).

### **2.3.4. pH**

El género Dunaliella a su vez también tiene especies que toleran diversos rangos de pH que van de 0 a 11; se sabe que para la especie *D. salina*, los rangos de pH optimo son de 8 y 11; mientras que *D. acidophila* es una especie que puede llegar a crecer en ambientes extremadamente ácidos, con valores de pH 0-1 (Barbosa et al., 2013).

### **2.3.5. Salinidad**

Dunaliella al ser organismos halotolerantes, pueden habitar ambientes con niveles de salinidades saturados, ya que pueden adaptarse a los cambios repentinos de las

mismas que pueden ir desde un 0,2 % hasta un 35 % de salinidad; entre las especies que más destacan en los ambientes hipersalinos se encuentran *D. pseudosalina*, *D. parva*, *D. salina*, *D. bardawil* y *D. viridis* (Kitto et al., 2011; El-Baz et al., 2019).

#### **2.4. Organismos productores de carotenoides**

Los carotenoides son uno de los grupos de compuestos más estudiados en la última década debido a su bioactividad y sus aplicaciones en las diferentes industrias; de hecho, han tenido una gran acogida científica por la amplia información existente sobre su biodiversidad, así como sobre los factores que afectan a su composición y actividad biológica (Britton, 2020).

Son pigmentos naturales, es decir, son sintetizados por diferentes grupos de organismos vivos, como plantas superiores, animales, microorganismos, hongos inclusive; y se sabe que estos biocompuestos presentan diferentes coloraciones, como amarillo, rojo, naranja y morado; caracterizados además por su fácil extracción, purificación, además de que presentan bajos costes y efectos secundarios nulos (Li et al., 2012; Wang et al., 2012).

Entre las fuentes de carotenoides de origen natural, los microorganismos más importantes en la síntesis de dichos metabolitos son las microalgas *H. pluvialis*, *D. salina*, *B. braunii*, hongos como *B. trispora*; así mismo existe un listado de

levaduras, bacterias, entre otros microorganismos. Dentro del grupo de los carotenoides, podría considerarse el  $\beta$ -caroteno como uno de los carotenos de mayor interés (Urnau et al., 2019).

#### **2.4.1. Clasificación de carotenoides**

Los carotenoides son potentes antioxidantes. Gracias a ello, por un lado, pueden proteger a los organismos que los sintetizan del estrés oxidativo causado por diversos factores ambientales (Chatragadda et al., 2021).

Existen dos tipos de carotenoides que son químicamente diferentes entre sí debido a la presencia o ausencia de oxígeno. Los carotenoides hidrocarbonados o carotenos: los cuales están compuestos únicamente por hidrógeno y carbono formando así lo que se conoce como una cadena poliinsaturada, ya sea cíclica o lineal, con la fórmula química  $C_{40}H_{56}$ . Se distinguen con facilidad debido a las tonalidades que presentan, como rojo, amarillo y naranja, ejemplo de este grupo, el  $\alpha$ -caroteno, el  $\beta$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina. Por otro lado, tenemos las xantofilas las cuales son un grupo que están conformados por carbono, hidrógeno y oxígeno en forma de grupos hidroxilo, epoxi u oxo, por estas características suelen ser denominadas como oxicarotenoides. La fórmula química general de la xantofila es  $C_{40}H_{56}O_{1-4}$ ; las xantofilas son derivados de los carotenos por la adición de grupos funcionales que contienen oxígeno, como  $COOH$ ,  $-OH$ ,  $=O$  en uno o ambos extremos, lo cual ayuda en la mejora de su propiedad hidrosoluble. Dentro de este

grupo podemos encontrar principalmente luteína, la zeaxantina, la violaxantina, la fucoxantina, astaxantina, criptoxantina y capsantina (Riaz et al., 2021).

#### 2.4.2. $\beta$ -caroteno

Es el primer carotenoide nutracéutico que en campos como la bioprospección es considerado uno de los más importantes, por ello es el más estudiado, ya que además es el caroteno provitamina A más potente. El  $\beta$ -caroteno es el isómero de caroteno más común y está presente en diversos organismos del reino vegetal. Este metabolito es un carotenoide fotosintético primario, es decir, su presencia en el centro de reacción del fotosistema II ayuda a transportar la energía de excitación a la clorofila y con ello, a eliminar las especies reactivas del oxígeno.

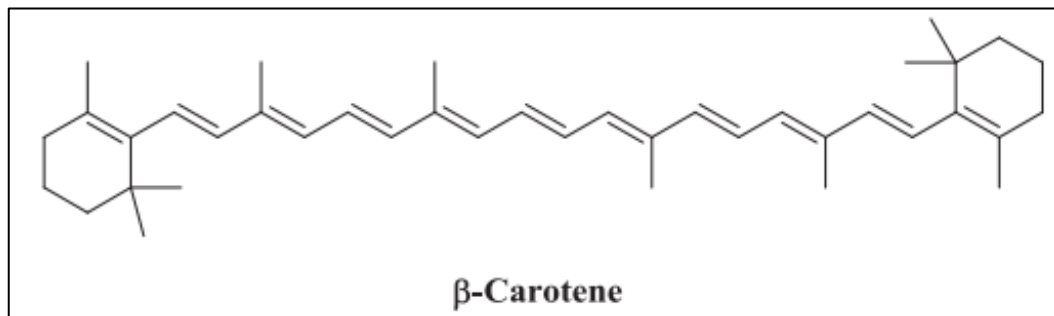
El  $\beta$ -caroteno puede ser diferenciado del  $\alpha$ -caroteno ya que contiene un anillo  $\beta$ -ionona en ambos extremos de su cadena; de forma natural está presente en varias formas isoméricas, en las que 9-cis y all-trans constituyen casi el 80 % del  $\beta$ -caroteno total. La fórmula general del  $\beta$ -caroteno es  $C_{40}H_{56}$  con un peso molecular equivalente a 536,9 (Zia-Ul-Haq, 2021).

En la actualidad se sabe que la microalga *Dunaliella salina* es fuente más eficiente para la producción de  $\beta$ -caroteno natural, bajo condiciones de cultivos de estrés; cuando se realizan dichos cultivos con condiciones como alta temperatura, alta

salinidad, intensidades de luz extremas y hasta con deficiencia de N, las células de *Dunaliella* se estresan, produciendo así, carotenoides que son metabolitos que ayudan en la protección de las células antes estas condiciones, entre las cuales destaca el  $\beta$ -caroteno, lo cual provoca un cambio en la morfología y fisiología de las células (Abu-Rezq et al., 2010).

**Figura 2.** Estructura de  $\beta$ -caroteno

Fuente: (Zia-Ul-Hag, 2021)



### 2.4.3. Ruta biosintética de carotenoides

Para que se lleve a cabo la síntesis de carotenoides, existe una molécula precursora para dicho proceso, la cual es el geranilgeranilo pirofosfato “GGPP”; para ello el primer paso es la síntesis de dicha molécula, mediante la enzima catalizadora geranilgeranilo pirofosfato sintasa “GGPS”, en la que se añaden tres moléculas de isopentenil pirofosfato “IPP” a una molécula de dimetilalilo pirofosfato “DMAPP”, a través de reacciones secuenciales (Hirschberg, 2001; Xu et al., 2021).

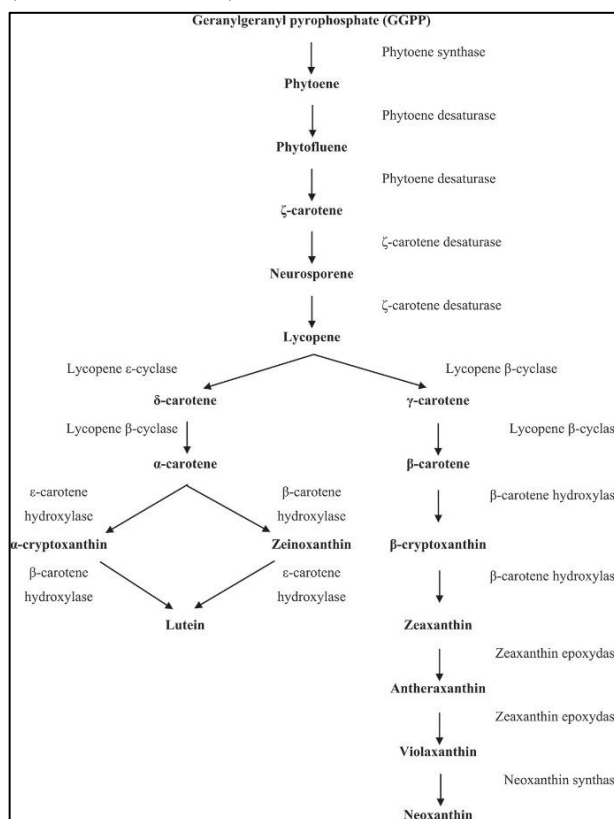
Los organismos que producen carotenoides, realizan este proceso a partir de la síntesis del GGPP; proceso que parte de la conjugación de dos moléculas de GGPP

para la formación del primer carotenoide incoloro denominado fitoeno, mediante la enzima PSY o fitoeno sintasa por sus siglas en inglés, dicha enzima es conocida como un elemento primordial en la síntesis de los carotenoides; además de que ayuda en la regulación del flujo de carbono en la formación de estos metabolitos, durante este proceso se producen reacciones de isomerización. Al formarse la molécula de fitoeno, existe una desnaturalización que produce otras moléculas como fitoflueno,  $\zeta$ -caroteno, neurosporeno y licopeno.

A partir de la formación del licopeno, aparecen dos vías que llevan a la formación de otros carotenoides conocidos como cíclicos y acíclicos; se conoce que el  $\beta$ -caroteno es un carotenoide cíclico, por lo que especies que producen este metabolito dirigen sus procesos fisiológicos hacia la ruta cíclica. A partir de aquí, se añaden anillos de ciclohexeno a uno o ambos extremos de la molécula de licopeno, mediante la enzima licopeno ciclasa (LYC), y tiene lugar la formación de  $\delta$ -,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\beta$ -caroteno principalmente (Ye et al., 2008).

**Figura 3.** Vía metabólica de producción de carotenoides en *Dunaliella*.

Fuente: (Barbosa et al., 2023).



## 2.5. Determinación de carotenoides totales por espectrofotometría

Para analizar el contenido de carotenoides totales se puede realizar mediante espectroscopia UV y visible. Estos métodos convencionales presentan limitaciones; sin embargo, siguen siendo empleados para este tipo de análisis debido a la simplicidad en la ejecución. Se utiliza un espectrofotómetro con la finalidad de medir la cantidad de luz que absorbe una muestra.

Esta técnica funciona de la siguiente manera, al introducir la muestra en el quipo, pasa un haz de luz a través de la misma y se mide la intensidad de la luz que llega al detector, lo cual se define como absorbancia. Es importante conocer que, en

espectrofotometría, la absorbancia está estrechamente relacionada a la concentración de la muestra, por lo que se recomienda extraer todo el contenido de pigmentos para tener datos confiables, además de que las absorbancias y ecuaciones que se aplican están definidas de acuerdo al tipo de solvente utilizado en la extracción del contenido de pigmentos (Mahmood et al., 2021).

## **2.6. Determinación de $\beta$ -caroteno mediante HPLC**

La HPLC es una forma de cromatografía utilizada con frecuencia en campos como química analítica y la bioquímica con la finalidad de separar, identificar y cuantificar compuestos de interés. En este equipo, cada muestra es analizada en una columna bajo condiciones específicas y se comparan los tiempos de retención del pico obtenido en las muestras con respecto al del  $\beta$ -caroteno estándar analizado en condiciones similares. Las áreas de recorrido de los picos de las muestras se utilizan para calcular la concentración de los compuestos que se desean analizar.

Suelen contener fases inversas o normales. Este equipo se encuentra conformado por una columna primaria interconectada con una o incluso varias columnas adicionales, conocidas como columnas secundarias; permitiendo que parte del efluente que se eluye de la primera columna pase a través de la segunda columna mediante el uso de una válvula conmutada (Kimura et al., 2005).

## **2.7. Medios de cultivos empleados para Dunaliella**

Para cultivos de *Dunaliella* se han empleado diversos medios de cultivos adecuados para este tipo de microalgas, entre los medios usados para *Dunaliella*, podemos encontrar:

- Medio Johnson modificado.
- Medio ASP modificado.
- Medio de agua de mar f/2 de Guillars.
- Medio Parvasoli (PES)
- Medio artificial (ART)
- Medios Conway
- Medio BG11 + NaCl

Estos medios de cultivos se han probado tanto para realizar cultivos vegetativos como en cultivos de estrés para producción de metabolitos de interés biotecnológico (Tafreshi et al., 2009; Colusse et al., 2020).

### **2.7.1. Medio de cultivo Guillard F/2**

El medio utilizado para *Dunaliella* fue en el medio Guillard F2, es importante que *Dunaliella* al no presentar una pared celular no necesita solución de silicatos, por lo que se omite y solo se fertiliza con solución de macronutrientes, micronutrientes y solución de vitaminas.

**Tabla 1.** Soluciones del Medio de cultivo Guillard F/2

<b>MEDIO GUILLARD F2</b>	
<b>Solución 1</b>	<b>g/100mL</b>
Nitrato de Sodio ( $NaNO_3$ )	7.5
Fosfato monobásico de sodio monohidratado ( $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ )	0.5
<b>Solución 3</b>	<b>g/100mL</b>
Cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ) EDTA	0.32
disódico ( $Na_2 \cdot EDTA$ )	0.44
<b>Solución de metales traza</b>	<b>0.10 mL</b>
Sulfato de cobre (II) pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )	0.49
Sulfato de zinc heptahidratado ( $ZnCl_4 \cdot 7H_2O$ )	1.1
Cloruro de zinc (ZnCl)	0.53
Cloruro de cobalto (III) hexahidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.5
Cloruro de manganeso (III) tetrahidratado ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	9.0
Molibdato de sodio dihidratado ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.32
<b>Solución de vitaminas</b>	<b>mg</b>
Tiamina B1	0.1
Cyanocobalamina B12	0.5
Biotina H	1.0

Nota: Tabla obtenida de Guillard (1975).

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Materiales y métodos

Este trabajo se desarrolló bajo el marco del proyecto I+D+I-XVII-2023-4-Carotenoides en microalgas financiado por RED CEDIA, con la microalga *Dunaliella* sp., registrada con el código PM018 de la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas y Prácticas Académicas (CIBPA). Tiene el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

El componente experimental se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencias del Mar y los análisis de cromatografía para determinación de  $\beta$ -caroteno se realizaron en los laboratorios de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

#### 3.2. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental aplicado a un enfoque cuantitativo, debido a que se manipulan variables independientes (parámetros físicos – químicos), y el efecto que estas condiciones causan en las variables dependientes (concentración de carotenoides totales y  $\beta$ -caroteno) en cultivos bajo condiciones controladas; además que se analizan y comparan datos estadísticos con

respecto a las concentraciones de metabolitos producidas por las microalgas bajo ciertas condiciones de estrés. Cuenta con una parte aplicada al enfoque cualitativa ya que se describirán las características morfológicas de las células en proceso de carotenogénesis. Adicional, debe tomarse en cuenta que es de tipo aplicada, debido a que tiene como finalidad, optimizar las condiciones de cultivo en fase de estrés para la producción de dos metabolitos de interés biotecnológico.

### **3.3. Cultivo vegetativo**

#### **3.3.1. Mantenimiento de cepa**

La investigación inicio con cultivos solidos en cajas Petri, empleando Bacto-agar a una relación de 2%, fertilizada con el medio Guillard F2 (Guillard, 1975) con la finalidad de obtener un cultivo puro. Este agar se esterilizó en autoclave a 120°C y 1.1 kg/cm<sup>2</sup> (15 PSI) de presión durante 15 minutos; se dejó enfriar el medio y posteriormente se vertió 20 mL del medio en las cajas Petri (Arredondo et al., 2007).

Para la siembra se escogió un cultivo masificado con las mejores células, esto se realizó mediante observaciones al microscopio para asegurar que las placas de agar tengan éxitos con respecto al crecimiento de las colonias; con un asa de platino se tomó una alícuota y se procedió a realizar el rayado en zigzag, se cubrieron las placa y fueron selladas con Parafilm, se rotularon y se dejaron de forma invertida direccionadas a la luz bajo las siguientes condiciones:

**Tabla 2.** Parámetros de cultivos.

pH: 8	Luz: $30 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$
Salinidad: 35 ppt	Temperatura: $24 \pm 2^\circ\text{C}$

Nota: Parámetros a los que ya se ha cultivado *Dunaliella* sp. en fases iniciales.

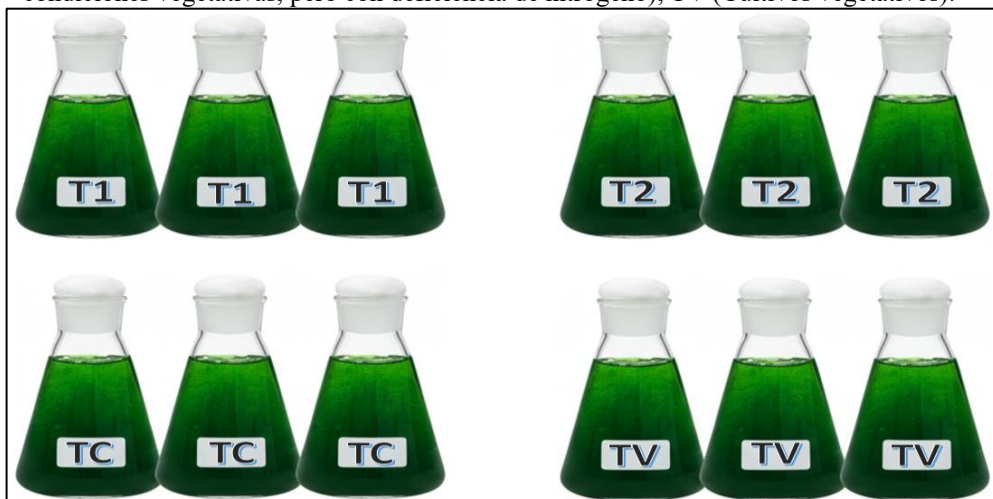
El crecimiento de las colonias comenzó a ser evidentes al día 5 y para el día 7 ya había colonias suficientes para ser sembradas en tubos.

### **3.3.2. Escalamiento de cultivo vegetativo**

Para comenzar con los escalamientos (colonias de cultivos sólidos a medio líquido), se observaron las placas al microscopio para corroborar que las colonias fueran puras sin contaminación por otra microalga y fueron aisladas con ayuda de un asa de platino previamente esterilizado, siguiendo la metodología de Arredondo et al (2017). Las colonias de microalgas fueron inoculadas en tubos de ensayo con 10 ml de medio (agua de mar esterilizada y fertilizada), posteriormente los tubos fueron tapados con Parafilm y se dejaron con una gradilla en una zona con los mismos parámetros de cultivos sólidos, con fotoperiodo 12/12 (luz/oscuridad) y aireación por agitación manual (4 veces al día); los tubos fueron repicados al día 7 que presentaron tonalidad concentrada y células activas. Para ello, con un tubo se realizó un cultivo madre hasta tener un volumen de 1.5 L, con la finalidad de que la misma pueda ayudar a iniciar los precultivos con una misma densidad celular, que fue de  $1.8 * 10^5$  Cell/mL.

Las transferencias fueron realizadas en una relación 2:1, permitiendo una mejor adaptación de la cepa a las nuevas condiciones de resiembra. Es decir, se iniciaron con cultivos de 300 mL, los cuales fueron transferidos a un volumen de 900 mL y finalmente pasaron a un volumen de 3000 mL (3L), los parámetros de cultivos experimentales: temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ , salinidad de 35 ppt, pH oscilo de 7.7 a 8.1 y una iluminación de  $50\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con fotoperiodo 12:12 (luz/oscuridad) (Nguyen et al., 2020). Para la investigación se formaron 4 grupos experimentales, denominados: T1 “ $500\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ” y deficiencia de N, T2 “ $800\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ” y deficiencia de N”, TV “grupo vegetativo” y TC “grupo control”; todos estos grupos llevaron las mismas condiciones para el cultivo vegetativo (Figura 4), sin embargo, para la fase de estrés ya cambiaran dichas condiciones y el grupo TV “cultivos vegetativos” fueron cosechado al terminar el periodo vegetativo, con la finalidad comparar el contenido de pigmentos con los grupos que serán sometidos a periodos de estrés.

**Figura 4.** Grupos experimentales: T1 ( $500\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno); T2 ( $800\ \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno); TC (Control, condiciones vegetativas, pero con deficiencia de nitrógeno); TV (Cultivos vegetativos).



### 3.3.3. Densidad Celular y Tasa de Crecimiento

Se destinaron 3 matraces de 300 mL para poder realizar la curva de crecimiento y conocer las densidades celulares, con la finalidad de conocer los días que tardarían los cultivos en llegar a su fase logarítmica exponencial el cual fue en el día 9. Estos conteos se realizaron mediante conteos celulares en un microscopio OMAX cada 24 horas, empleando un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, para este proceso se tomó muestras de 1 mL de cultivos por triplicados destinados para la curva de crecimiento, continuamente se agregó a cada muestra 20 µl de Lugol para que las células motiles de *Dunaliella* sp. se fijaran y se pueda realizar el conteo.

La fórmula para determinar la densidad celular es la recomendada por (Arredondo et al., 2017):

$$C = N \times 10^4 \times dil$$

Donde:

C= Células mL<sup>-1</sup>

N= promedio de células en cada cuadrante (A, B, C y D).

10<sup>4</sup>= factor de conversión de 0.1 µL a 1 mL

FD= factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra).

La tasa de crecimiento se describe mediante la siguiente ecuación propuesta por (Guillard, 1973).

$$\mu = \frac{\ln X^2 - \ln X^1}{T_2 - T_1}$$

En donde:

$\mu$  = Tasa de crecimiento ( $d^{-1}$ )

X = concentración celular ( $Cél\ mL^{-1}$ ) en dos tiempos de la fase exponencial y/o logarítmica de crecimiento.

$\ln$  = logaritmo natural de  $X_2$  y  $X_1$

T = tiempo en días

#### **3.3.4. Concentración y productividad de biomasa**

La concentración de la biomasa se determina mediante las ecuaciones recomendadas por (Alvear et al., 2011):

$$CB = \frac{PB}{V_{\text{cultivo}}}$$

Donde: CB: concentración de biomasa ( $gr/L^1$ ); PB: peso de biomasa seca (gr); V: volumen de cultivo (L)

Para calcular la productividad de la biomasa se empleó la siguiente fórmula (Apandi et al., 2021)

$$P = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1}$$

X2 y X1= concentración de biomasa al final e inicio del periodo (gr/L<sup>1</sup>),

t2-t1= intervalo de tiempo (días, horas, etc.), P se expresa en g L<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>.

### **3.4. Inducción a carotenogénesis**

#### **3.4.1. Condiciones de estrés**

Al finalizar los cultivos vegetativos de 3 litros en el día 9 que alcanzaron su fase logarítmica exponencial, se cosecho el grupo vegetativo (TV) ya que este grupo serviría posteriormente para los análisis bioquímicos, los grupos T1, T2 y TC pasaron a fase de estrés y fueron ubicados en una cámara de estrés y las condiciones de estrés se describen a continuación:

Existieron 2 condiciones de estrés de 2 variables cada una y un grupo control (Figura 5):

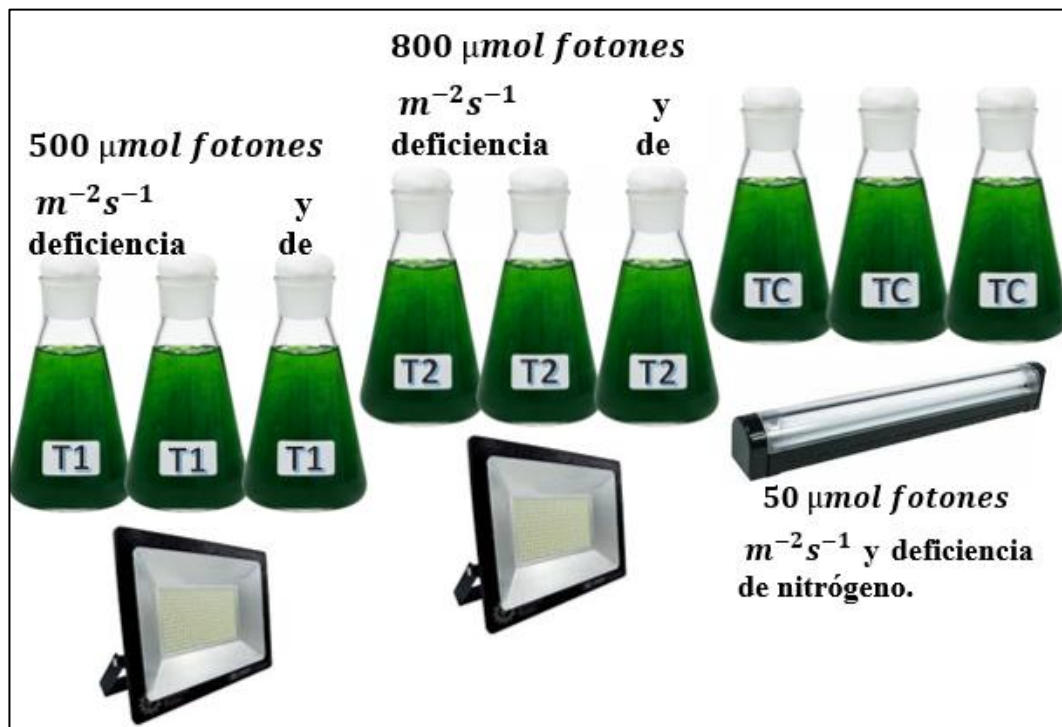
Grupo 1 (T1) fue sometida a una intensidad lumínica de 500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno.

Grupo 2 (T2) cultivos sometidos a una intensidad lumínica de 800  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno.

Grupo control (TC), intensidad lumínica de  $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficiencia de nitrógeno.

Importante mencionar que cuando iniciaron su fase de estrés, los cultivos fueron fertilizados ya que para este lapso de tiempo los nutrientes ya fueron consumidos por las microalgas, sin embargo, en el proceso de fertilización los cultivos fueron privados de solución 1 del medio Guillard F2, el cual es la fuente de nitrógeno; la temperatura se mantuvo en un rango de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  ya que los reflectores emitían calor, mientras que el pH se mantuvo en 8 – 8.5.

Figura 5. Grupos experimentales de estrés



### 3.4.2. Conversión de lux a $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ de fotones.

Para inducir al estrés lumínico de las microalgas se utilizando reflectores led de luz blanca de 6500 W, debido a que no existe un factor de conversión general para PPFD, el mismo va a variar según las distintas fuentes de luz para su conversión a  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Por lo que Osram, (2000) recomienda usar un factor de conversión de 0.0149 para esta fuente de luz; dicho esto, el grupo T1 estuvo sometido a una intensidad lumínica de  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  correspondiente a 33.330 Klux, mientras que el grupo T2 se sometió a una intensidad lumínica de  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  correspondiente a 53.330 Klux, ambos grupos con deficiencia de nitrógeno; mientras que el grupo control se mantuvo a una intensidad lumínica de  $50 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  correspondiente a 3.700 lux con deficiencia de nitrógeno, las intensidades de luz fueron medidos a través de un luxómetro de amplio espectro (marca EXTECH).

### 3.4.3. Respuesta a estrés.

Para evaluar la respuesta de los cultivos a las condiciones de estrés se realizarán observaciones al microscopio (cada 2 días) para analizar los cambios morfológicos de las células y coloración máxima que alcance al final del proceso de carotenogénesis. Además, se realizarán recuentos celulares hasta el momento que se pueda realizar dichos conteos en la cámara de Neubauer, con la finalidad de saber en qué % se pierde la biomasa durante el proceso de estrés.

#### **3.4.4. Cosecha de biomasa.**

La cosecha de las biomásas fue realizada mediante una centrifuga Hermle® 306, en la que se colocaron los cultivos en tubos falcón de 250 mL y centrifugados a 3500 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue recolectado en tubos falcón de 50 mL para posteriormente ser lavado con NaCl al 1% con la finalidad de eliminar sales y demás impurezas (Takagi et al., 2006).

La biomasa fue recolectada en una caja Petri y se conservó en una refrigeradora a -20°C hasta el momento de someter al secado de la biomasa (Guevara et al., 2016), este proceso de secado se realiza en estufa a 37°C por 24 horas y en oscuridad para evitar la degradación de pigmentos.

#### **3.4.5. Extracción de carotenos.**

Se pesaron muestras de 105 mg en tubos falcón de 15 mL, añadiendo además perlas de acero, continuamente se homogenizaron en vórtex a 3000 rpm por 1 minuto para ayudar en la ruptura de la membrana celular de *Dunaliella*. Posteriormente, se añadieron 5 mL del solvente (metanol al 90%) y se realizó nuevamente el proceso de agitación en vórtex, esta vez por 3 minutos; como siguiente paso, las muestras se dejaron reposar 24 horas a 4°C con la finalidad de que el solvente actué sobre las células y permita la extracción con mayor facilidad.

Pasado las 24 horas, se retiraron las muestras y se realizó el proceso de agitación en vórtex, por consiguiente, se centrifugaron las muestras a 3500 rpm por 5 minutos y se recuperó el extracto en matraces Erlenmeyer de 50 mL previamente forrados para evitar la degradación de pigmentos al momento de realizar los análisis. El proceso de extracción se repite hasta que el extracto no presente coloración (Macias-Sánchez et al., 2008). Es importante conocer que este proceso de extracción es realizado en áreas con ausencia de luz, y sobre hielo para evitar la degradación por la temperatura y luz; preferible trabajar en cámaras de extracción ya que los solventes orgánicos son muy peligrosos.

#### **3.4.6. Método analítico.**

Las concentraciones totales de carotenoides y clorofilas se determinarán midiendo la absorbancia de las muestras con un espectrofotómetro Thermo Scientific™, a longitud de onda de 665.2, 652.4 y 470 nm. Las ecuaciones que se usaron para determinar las concentraciones de carotenoides y clorofilas, son las propuestas por Lichtenthaler et al., (2001).

La concentración de carotenoides totales se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$C_{x+c} = \frac{1000A_{470} - 1.91C_a - 95.15C_b}{225}$$

Para determinar las concentraciones de clorofilas, se calculan mediante la siguiente ecuación:

$$C_a = 16.82A_{665.2} - 9.28A_{652.4}$$

$$C_b = 36.92A_{652.4} - 16.54A_{665.2}$$

### **3.5. ANÁLISIS DE $\beta$ -CAROTENO.**

#### **3.5.1. Lugar de estudio.**

La extracción y análisis de  $\beta$ -caroteno, se llevó a cabo en los laboratorios de investigación y vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar, Laguacoto II, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia de Bolívar, Ecuador.

#### **3.5.2. Extracción de pigmentos.**

Para la extracción de pigmentos, se realizó mediante una combinación de solventes: 50% metanol y 50% cloroformo grado HPLC; para ello se tomó inicialmente 100 mg de las muestras experimentales en tubos de 2 ml a los cuales se agregaron perlas de acero, seguido de ello, se homogenizaron las muestras en vórtex durante 1 min.

Posteriormente se pesaron 15 mg de las muestras homogenizadas en tubos de centrifuga ámbar de 1.5 mL, a las que se agregaron 100  $\mu$ l de agua tipo I y se agitaron en un vórtex durante 15 segundos, luego se dejaron reposar las muestras durante 30 minutos en refrigeración, con la finalidad de limitar la actividad biológica durante la rehidratación.

Transcurrido este periodo de tiempo, se añaden 500 $\mu$ l de metanol y se agitaron en vórtex durante 15 minutos; seguido de esto, se añadieron 500  $\mu$ l de cloroformo y se repite el proceso de agitación en vórtex durante 15 segundos; a continuación, se

centrifugan las muestras a 5000 RFC por 5 minutos. Finalmente se transfiere el sobrenadante en balones de aforo ámbar de 5 mL; se repite este proceso de añadir metanol y cloroformo, vórtex y centrifugación hasta que el extracto no presente coloración.

Se realizan diluciones de las muestras en metanol: acetona (8: 2 v/v); las diluciones del extracto y solvente fueron en una relación (1: 1 v/v) respectivamente, es decir, 600µl de extracto y 600µl del solvente. Las muestras diluidas se filtraron a través de filtros de jeringa de PFTE de 0.45 µm en viales ámbar de HPLC y finalmente se conservaron las muestras a -20°C hasta su posterior análisis (Rowland et al., 2022).

### **3.5.3. Detección de β-caroteno mediante HPLC.**

El análisis de β-caroteno se realizado en un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución HPLC modelo 1260 Infinity, Agilent Technologies. En la que las separaciones analíticas se realizaron a través de una columna Kinetex 5 µm EVO C18 100 Å150 x 4.6 mm, a una temperatura de 25°C.

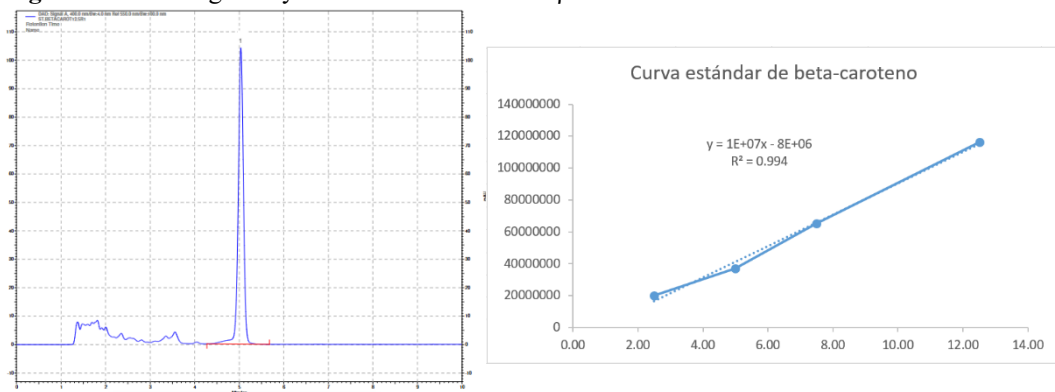
Las fases móviles utilizadas para este método analítico fueron: 80 % Metanol: 20 % Acetato de Etilo. El caudal se fijó en 1.0 mL/min, con un volumen de inyección de 8µl y un tiempo de corrida de 10 minutos. La detección de β-caroteno se realizó

mediante un detector de matriz de diodos (DAD) entre 400 – 500 nm (Lourenço-Lopes et al., 2022).

### 3.5.4. Análisis de datos.

Se realizó una curva de calibración con el estándar de  $\beta$ -caroteno, para esto, se realizó una solución madre de 100 ppm, para realizar diluciones en rangos de concentraciones de 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm, 10 ppm y 12 ppm, para conocer las áreas de recorrido y los tiempos de retención. Posteriormente, los resultados obtenidos de las inyecciones de las muestras se compararon con los datos obtenidos en el estándar de  $\beta$ -caroteno mediante la extrapolación de la curva de calibración; los datos fueron expresados en mg/gr (Figura 6).

**Figura 6.** Cromatograma y curva de calibración de  $\beta$ -caroteno estándar.



### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

Los análisis estadísticos se realizaron en los softwares Microsoft Excel para las tabulaciones de datos y RStudio, para los análisis estadísticos y graficas; se realizaron los análisis de supuestos con Test de normalidad de Shapiro-Wilk y Test de Homogeneidad de Levene; mismos que nos indujeron a aplicar pruebas de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, con un nivel de significancia de 95% ( $p \leq 0.05$ ) posterior se realizaron test de Post-Hoc para identificar las diferencias entre grupos.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS

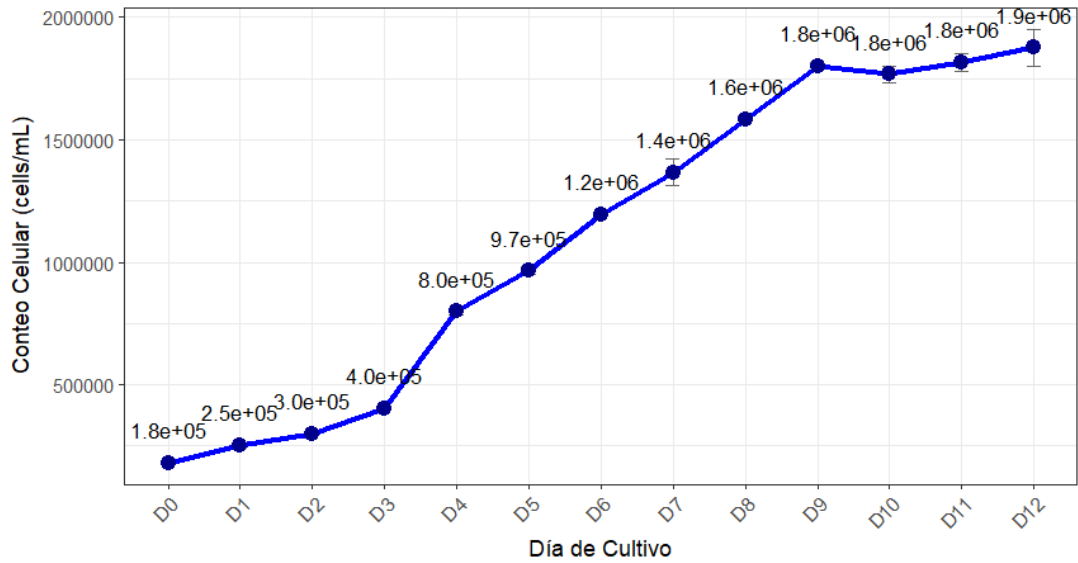
#### 4.1. Densidad celular

Como primer parte experimental se desarrolló una curva de crecimiento, con la finalidad de conocer los días que les tomarían a los cultivos en llegar a su fase logarítmica exponencial y conocer en qué día se realizarían las transferencias; esta fase experimental fue ejecutada con cultivos en matraces de 300 mL por triplicado.

Los cultivos de *Dunaliella* sp. iniciaron su periodo de adaptación con una densidad celular media de  $1.8 * 10^5$  cell/mL en el día 0, presentando como periodo de adaptación los 3 primeros días, ya que los conteos no presentaban diferencias, sin embargo, en el día 3 empezaría el inicio del crecimiento exponencial con  $4.0 * 10^5$  cell/mL, periodo que se extendió hasta el día 9 finalizando con una densidad celular de  $1.8 * 10^6$  cell/mL; a partir de ahí los datos no presentaban diferencias, lo que da indicio que entro a fase estacionaria como se muestra en la Figura 7.

Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se evidencio que los cultivos no presentaban diferencias significativas, con un valor de  $p (=0.991)$ , por lo que su crecimiento es replicable con los parámetros establecidos.

**Figura 7.** Curva de crecimiento de *Dunaliella* sp.



#### **4.1.1. Tasa de crecimiento y productividad de biomasa.**

##### **4.1.1.1. Tasa de crecimiento**

También denominada como velocidad de crecimiento, en la que se obtuvo una tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) media de  $0.36 \text{ d}^{-1}$ . Este valor es indicativo de que el cultivo presento un crecimiento replicable, lo cual es característico de cultivos vegetativos en condiciones de laboratorio controlados; lo que refleja una actividad estable y sostenible.

##### **4.1.1.2. Productividad de Biomasa**

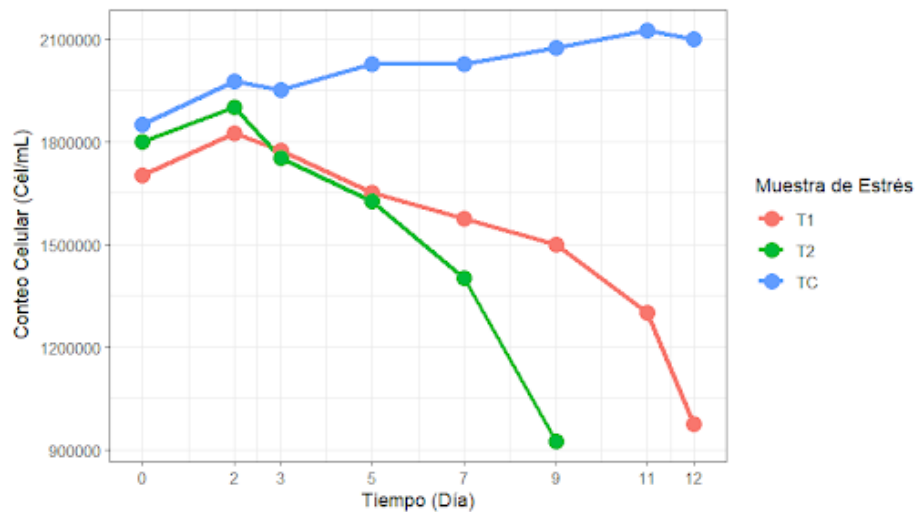
Con respecto a la productividad de biomasa en el cultivo vegetativo, el resultado fue de  $0.035 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Mientras que el grupo control tuvo una productividad de

0.021 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, seguido de los grupos T1 y T2 con 0.010 y 0.013 g L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup> respectivamente.

## 4.2.Inducción a carotenogénesis

### 4.2.1. Densidad celular en respuestas a estrés por intensidad lumínica y deficiencia de N.

**Figura 8.** Densidades celulares de *Dunaliella* sp. en cultivos de estrés; T1 (500 μmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> con deficiencia de N); T2 (800 μmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> con deficiencia de N); TC (50 μmol fotones m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> con deficiencia de N)



Al entrar en fase de estrés, los cultivos tuvieron un seguimiento mediante conteos celulares para evidenciar de qué manera afectaban las condiciones de estrés a las densidades celulares, los 3 tratamientos que pasaron a fase de estrés tuvieron un ligero crecimiento hasta el día 2, posteriormente el número de células fueron decreciendo a diferencia del grupo control (TC) que continuó creciendo de manera moderada debido a que ya habría terminado su proceso de crecimiento exponencial (Figura 8).

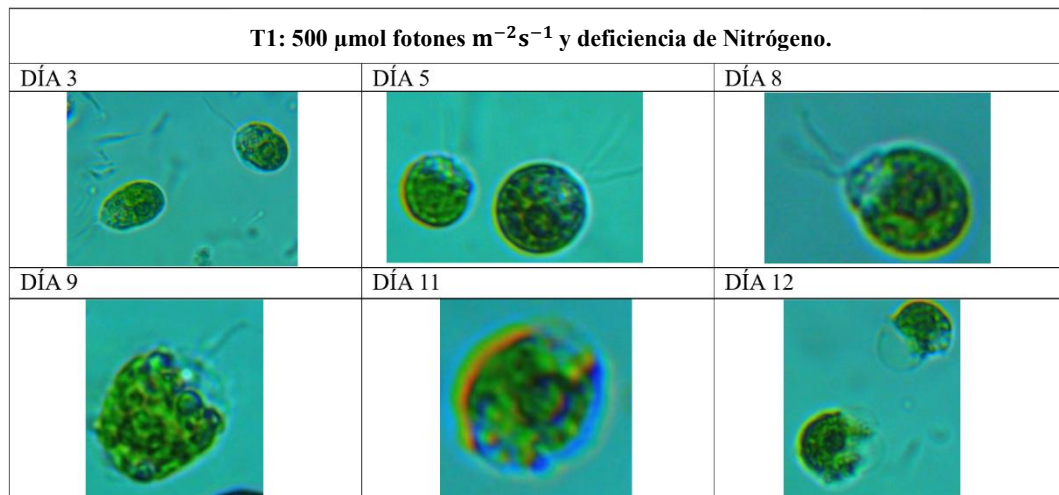
El grupo T1 correspondiente a cultivos sometidos a una intensidad lumínica de 500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N, inicio con una densidad de  $1.7\text{E}+06$  Cell/mL, para el día 2 se registró una densidad de  $1.83\text{E}+06$  Cell/mL, en los días posteriores decreció de manera significativa, de tal manera que termino su proceso de estrés con una densidad de  $9.75\text{E}+05$  Cell/mL con una duración de 12 días. Con respecto al grupo T2 perteneciente a cultivos sometidos a una intensidad lumínica de 800  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N, se inició con una densidad celular de  $1.80\text{E}+06$  Cell/mL en el día 0, tuvo un crecimiento hasta el día 2 con un registro de  $1.90\text{E}+06$  Cell/mL, a diferencia del grupo T1, el grupo T2 tuvo una duración de 9 días sometidos a estrés, finalizando con una densidad celular de  $9.25\text{E}+05$ ; evidenciando que la mayor intensidad lumínica tuvo un mayor impacto en las densidades celulares, por día y por número de células.

En los cultivos control (TC) la situación cambia completamente, ya que estos cultivos al seguir con las mismas condiciones de cultivos vegetativos, con la diferencia que no fueron suministrados con fuente de nitrógeno, siguieron creciendo, aunque de manera moderada; iniciando con una densidad de  $1.85\text{E}+06$  en el día 0 y finalizando con una densidad celular de  $2.10\text{E}+06$ ; una posible causa es que el nitrógeno al ser un macronutriente esencial para sus procesos fisiológicos, entre ellos el proceso de reproducción, al no tener esta fuente importante, el

crecimiento se vio limitado y pudo influir en la producción de metabolitos, los cuales serán explicados y analizados posteriormente.

#### 4.2.2. Morfología como respuesta ante estrés por intensidad lumínica y deficiencia de nitrógeno.

**Figura 9.** Cambios morfológicos de *Dunaliella* sp. sometidas a estrés 1 con 500  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N.

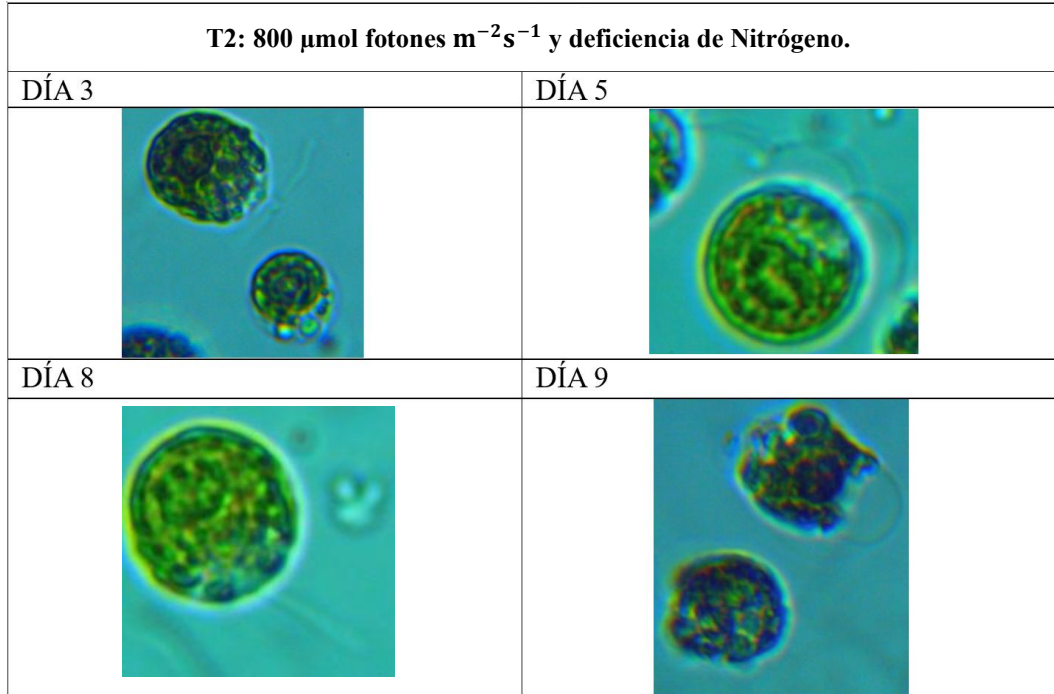


Uno de los principales cambios que se pudo notar en el día 3, es que las células presentaron un pequeño engrosamiento, y células en división celular. Para el día 5, las células ya se habían adaptado a la forma esférica, un comportamiento de protección de las células; en el día 8 seguían presentado formas esféricas y pocas células presentaron ausencia de flagelos.

En el día 9, algunas células presentaron un ligero desplazamiento de la membrana plasmática y presentaban glóbulos pigmentados, en el día 11 y 12, muchas de las células presentaban deformidades, la mayoría con desplazamiento de la membrana

y pérdida de flagelos, además de que en los cloroplastos se mostraban glóbulos pigmentados, que podrían relacionarse con los pigmentos fotosintéticos (Figura 9).

**Figura 10.** Cambios morfológicos de *Dunaliella* sp. sometidas a estrés 2 con  $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N.



En los cultivos del grupo 2, hubo cambios notables desde el día 2, ya que la mayoría de las células presentaba cambios en su forma, en su mayoría presentaban una forma esférica a diferencia del grupo 1 que en este día mantenían su forma normal de vegetativas.

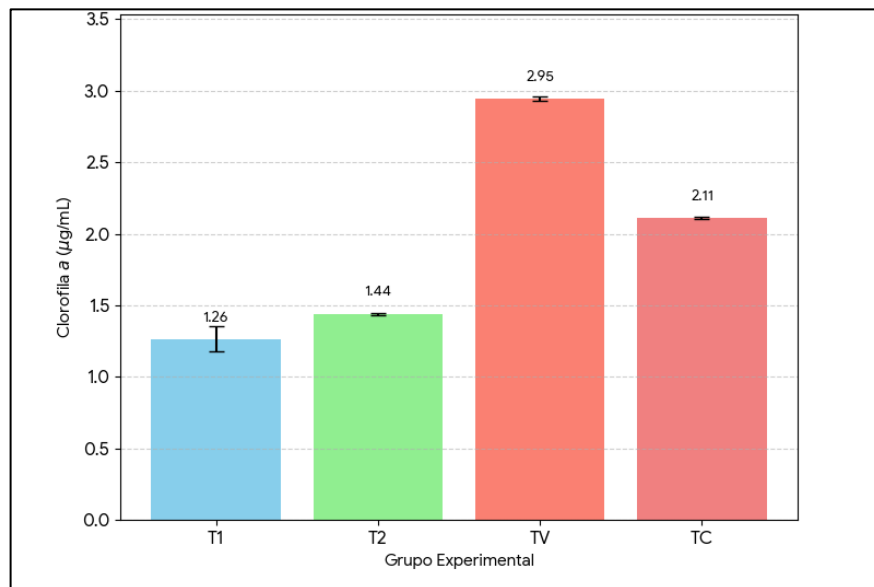
En el día 2, de igual manera las células mantenían la forma esférica y con mayor pigmentación por glóbulos amarillos y naranjas, pocas células tenían pérdidas de flagelos; durante el día 8 las células presentaban desplazamiento de membrana,

perdida de flagelos y presencia de glóbulos pigmentados. En el último día de estrés el desplazamiento de membrana era muy notorio, cambio muy común en el proceso de carotenogénesis, en su mayoría ya habían perdido flagelos y ya existían células destruidas (Figura 10).

### 4.2.3. Análisis de metabolitos mediante espectrofotometría.

#### 4.2.3.1. Clorofila a

**Figura 11.** Concentraciones de Clorofila a entre grupos experimentales de *Dunaliella* sp.



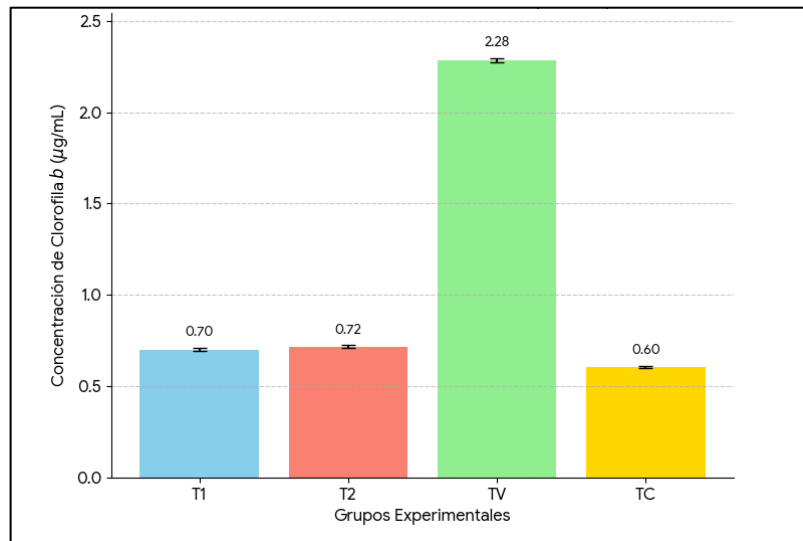
Con respecto a la clorofila a, el grupo con una mayor concentración de este pigmento fotosintético fue el grupo TV correspondiente a cultivos vegetativos, con una concentración de  $2.95 \pm 0.013 \mu\text{g/mL}$ , seguido del grupo control (TC) con una concentración media de  $2.11 \pm 0.007 \mu\text{g/mL}$ ; para los tratamientos de estrés, la situación cambia completamente, ya que las concentraciones fueron más bajas, con T2 ( $800 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N) presento una concentración de  $1.44 \pm 0.007 \mu\text{g/mL}$  mientras que el grupo T1 ( $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con

deficiencia de N) una concentración de  $1.26 \pm 0.018 \mu\text{g/mL}$ , mientras (Figura 11); todas las concentraciones fueron diferentes entre grupos, los cuales se confirmaron a través de la prueba de Kruskal-Wallis, dando un valor de  $p= (0.0001)$  siendo menor que ( $<0.05$ ), por lo que es significado de que existe diferencia significativa entre grupos (Anexo 11). Mediante la prueba de Post-Hoc de Dunn se corroboró todos los grupos presentaban diferencia significativa con valores menores a  $p= (<0.05)$

Este comportamiento es obvio, debido a que los cultivos vegetativos al estar en condiciones óptimas para su crecimiento, sintetizan de mejor manera la clorofila a, ya que los rangos de luz son los adecuados para una buena fotosíntesis y el principal pigmento fotosintético es la clorofila a. Por otro lado, el contenido de clorofila a en el grupo control se redujo, y esto podría explicarse a que como estuvieron un periodo más prolongado, las células pudieron disminuir su tasa fotosintética como método de protección debido a que el grupo control estuvo deficiente de nitrógeno, por lo que pudo sintetizar otros tipos de metabolitos. A comparación de los grupos que estuvieron en proceso de estrés por altas intensidades lumínicas y deficiencia de nitrógeno, los rangos de luz eran excesivos por lo que claramente las células disminuirán su tasa fotosintética para evitar la fotoinhibición y producir otros metabolitos que ayuden en la protección de la luz excesiva.

#### 4.2.3.2. Clorofila b

Figura 12. Concentraciones de clorofila b en grupos experimentales de *Dunaliella* sp.

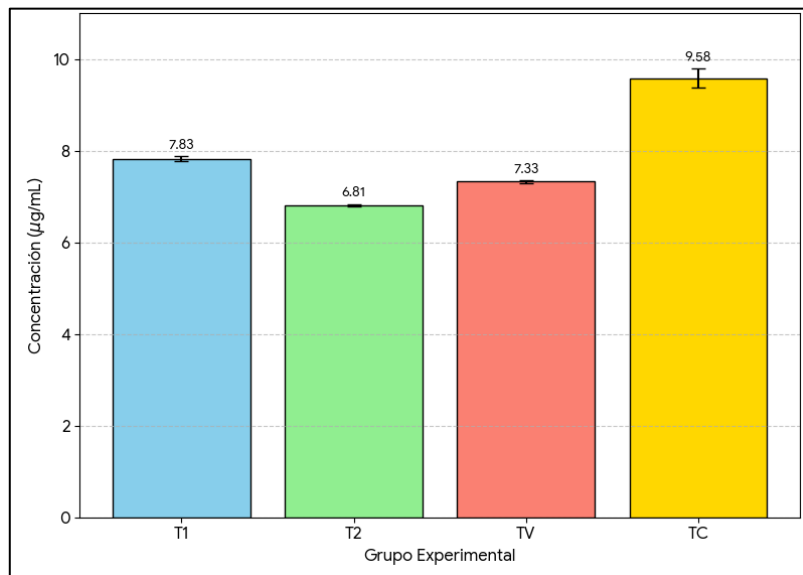


En las síntesis de clorofila b, tenemos que *Dunaliella* sp. sintetiza de manera más eficiente dicho pigmento en estado vegetativo con una concentración de  $2.28 \pm 0.02$  µg/mL, mientras que los grupos de estrés T1 y T2 tuvieron concentraciones similares con valores de  $0.70 \pm 0.02$  µg/mL y  $0.72 \pm 0.02$  µg/mL respectivamente; en este caso paso algo muy novedoso, ya que el contenido de clorofila b en el grupo control se redujo considerablemente, con un valor de  $0.60 \pm 0.01$  µg/mL. El Test de Kruskal-Wallis dio un valor de  $p= (0.0001)$  estableciendo que existía diferencia significativa entre grupos. Esta situación podría explicarse a que quizá las células de *Dunaliella* están produciendo mayor contenido de Chlb “Clorofila b” en estado vegetativo para maximizar sus procesos fisiológicos, mientras que cuando se alarga el periodo y existe deficiencia de nitrógeno, están centrándose en sintetizar otro tipo de pigmentos o metabolitos que ayuden en la protección de las células como es el

caso del grupo control TC, mientras que, en los cultivos de estrés, podrían estar sucediendo fotoinhibición por los rangos de luz excesivos (Figura 12).

#### 4.2.3.3. Carotenoides totales

**Figura 13.** Producción de carotenoides totales por grupos en *Dunaliella* sp.



En los análisis de carotenoides totales existieron diferencias significativas con respecto a las concentraciones por tratamientos, el grupo con mayor concentración de carotenos fue TC correspondientes al grupo control con una concentración de  $9.58 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$ , seguido del grupo T1 correspondiente al estrés de  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N, con una concentración de  $7.83 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ; en cambio el grupo TV y T2 presentaron una menor concentración de carotenoides, el grupo TV correspondiente a los cultivos vegetativos, que estaban a condiciones normales, una concentración de  $7.33 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  y finalmente el grupo T2 que corresponde a los cultivos sometidos a una intensidad de luz de  $800 \mu\text{mol fotones}$

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N, con una concentración de  $6.81 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$  (Figura 13).

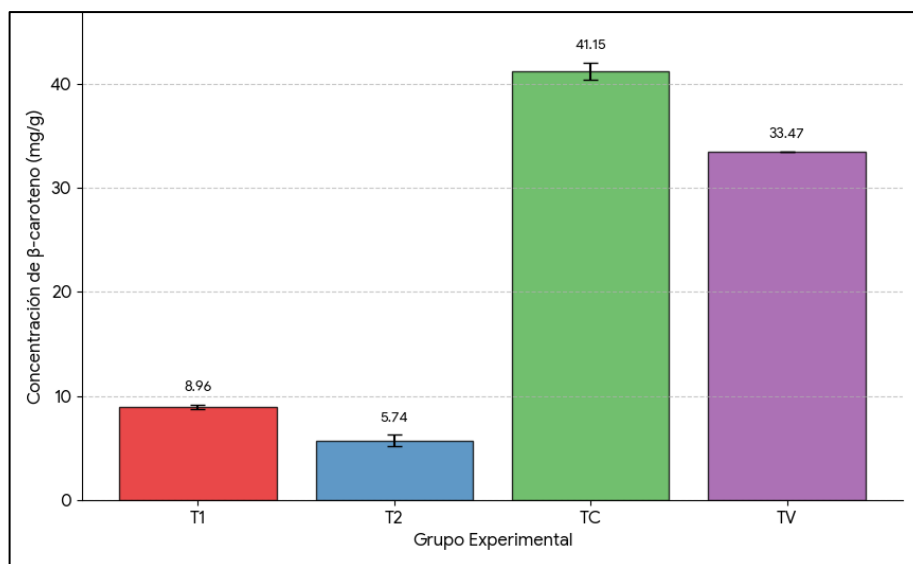
Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se corroboró si existía o no diferencias significativas entre grupos, dando un valor de  $p = (0.0001)$ , que al ser un valor menor que  $<0.05$ , se rechazó la hipótesis nula de dicha prueba; indicando que si existen diferencias en la producción de carotenoides totales. Por ello se realizó un test Post-Hoc de Dunn para saber que grupos presentaban diferencia, de los cuales entre los grupos T1 y T2 tienen diferencias estadísticamente significativas al igual que los grupos TC y TV con valores de  $p = (0.003)$  y  $(0.003)$  respectivamente, mientras que entre el grupo T2 y TC existió una diferencia significativa relevante por las concentraciones existentes con un valor  $p = (0.0001)$  (Anexo 10).

La posible causa de este comportamiento podría deberse a que cuando los grupos de estrés (T1 y T2) pasaron a dicha fase, fueron privadas de fuente de nitrógeno, incluyendo el grupo control (TC); sin embargo, este grupo siguió con los demás parámetros físicos-químicos de cultivos vegetativos como luz normal  $50 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , temperatura  $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH de 8 y salinidad 35 ppt, lo que pudo influir mucho en las concentraciones de carotenoides; la misma situación podría explicarse en el grupo sometido a  $500 \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N, esta intensidad lumínica es relativamente alta a las demás investigaciones que se han realizado con la cepa de estudio, pero durante la fase de carotenogénesis, pudieron desnaturalizarse algunos grupos de carotenoides; para los grupos (T2)  $800 \mu\text{mol}$

fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con deficiencia de N y (TV) cultivos vegetativos, sucede una situación diferente, el grupo T2 al estar sometida a condiciones extremas pudieron degradarse aún más los grupos de pigmentos además de que hubo una muerte celular mayor; a diferencia del grupo TV que al estar en condiciones normales de cultivo, ayuda a una mejor densidad celular, pero menor concentración de carotenoides.

#### 4.3. Análisis de $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp. mediante HPLC

Figura 14. Concentraciones de  $\beta$ -caroteno en *Dunaliella* sp.



En los análisis de  $\beta$ -caroteno; el grupo con una mayor producción de  $\beta$ -caroteno, fue el grupo control (TC) con una concentración de  $41.15 \pm 0.08$  mg/gr, seguido del grupo vegetativo (TV) con una concentración de  $33.47 \pm 0.02$  mg de  $\beta$ -caroteno / gr de muestra. Sin embargo, en los grupos sometidos a estrés, sucedió una situación diferente, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno disminuyeron drásticamente en los

tratamientos T1 y T2 con concentraciones de  $8.96 \pm 0.16$  y  $5.74 \pm 0.52$  mg de  $\beta$ -caroteno / gr de muestra respectivamente (Figura 14). Mediante la prueba de Kruskal-Wallis se evidencio que efectivamente, existía una diferencia significativa entre grupos, con un valor de  $p= (0.0003)$ . Por lo que también se acepta la hipótesis nula de la investigación, que nos indica que las altas intensidades de luz con deficiencia de nitrógeno no influyen en la producción de  $\beta$ -caroteno.

Este comportamiento podría explicarse, que las condiciones extremas, como intensidades de luz relativamente altas acompañadas con deficiencia o privación de N, podrían estar provocando una degradación de metabolitos en la cepa utilizada en la presente investigación, además de que claramente no es una cepa identificada como especie. Por lo tanto, lo que más estaría influenciando en la producción de metabolitos de interés, es la deficiencia de nitrógeno, ya que el grupo control (TC) que fue el grupo con la mayor producción de  $\beta$ -caroteno, continuo con las condiciones normales de un cultivo vegetativo, con la diferencia que no fue suministrada con fuente de N cuando los demás grupos entraron a fase de estrés. Además, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno fueron más altas que los carotenoides, lo cual puede justificarse que, en los procesos de extracción, la calidad de solventes, técnicas de extracción y equipos para la identificación fueron diferentes. Debido a que se trabajó con solventes de grado HPLC serían más eficientes los procesos de extracción y lecturas de resultados

## DISCUSIONES

Para conocer la cinética de crecimiento de *Dunaliella* sp, se evaluó mediante conteos diarios y cálculos matemáticos. Iniciando con una concentración media de  $1.8 * 10^5$  cell/mL y finalizando su fase logarítmica en el día 9 con una concentración  $1.8 * 10^6$  cell/mL, la densidad celular alcanzada en esta investigación, se asemejan a los resultados obtenidos por Sui et al. (2019), quien evaluó cultivos de *Dunaliella salina* en 2 fases, la primera consistió en realizar cultivos vegetativos para producir biomasa que posteriormente pasarían a estrés, durante su primera fase alcanzo densidades de  $1.5 * 10^6$  cell/mL en un periodo de 13 días.

Por otra parte, Borovkov et al. (2019), en sus resultados reportaron una densidad celular de  $1.63 * 10^6$  cell/mL en un periodo de 13 días, el valor no presenta gran diferencia con el valor obtenido en esta investigación. Estos datos también coinciden con los reportados por Colusse et al. (2020), evaluaron tres medios de cultivos, los cuales fueron el medio Conway, Guillard F/2 y Johnson, *Dunaliella* cultivada en el medio Guillard F/2 tuvo una densidad celular cercana a la reportada en esta investigación, con una densidad de  $162 \pm 10,69 * 10^4$  cell/mL. Morales et al. (2020) por otro lado, en su experimentación probó medios de Guillard a diferentes concentraciones de nitrógeno y salinidades, por lo que el medio F con  $150 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  con una salinidad de 45 UPS pudo alcanzar una densidad de

$1.8 * 10^6$  Cell/mL lo cual es muy semejante a la densidad de la presente investigación.

Para la tasa de crecimiento, *Dunaliella* sp. alcanzo un valor de  $0,36 \text{ d}^{-1}$  en el medio Guillard f/2, este dato es muy similar a lo reportado por Colusse et al. (2020) reportaron una tasa de crecimiento de  $0.373 \text{ d}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 1.85. Mientras que, Moura et al. (2020) reportaron una tasa de crecimiento de  $0.50 \text{ d}^{-1}$  en medio Guillard f/2, lo cual evidencia la efectividad del medio de cultivo. Una situación similar ocurrió en lo reportado por Vahdat et al. (2020) usando el medio Guillard f/2 en *H. pluvialis*, en la que se obtuvo una tasa de crecimiento de  $0.37 \text{ d}^{-1}$ .

En base al resultado obtenido para la productividad de biomasa, el cultivo obtuvo un valor  $0.035 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$ , este valor se encuentra dentro del rango de la investigación realizada por Moura et al. (2020) evaluaron a *Dunaliella tertiolecta* en el medio Guillard f/2, medio Basal de Bold y un medio Basal de Bold modificado en agua de mar, alcanzando una productividad de  $47 \text{ mg L}^{-1}\text{d}^{-1}$ . Resultados similares fueron obtenidos Colusse et al. (2020), reportaron una productividad de  $0.031 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  en *D. salina*, este valor ser acerca bastante a la cepa *Dunaliella* sp. aplicada en esta investigación. Borovkov et al. (2021), en su investigación reportaron valores de 0.022, 0.025 y 0.026 en cultivos de *D. salina*, sin embargo, esta microalga fue cultivada en un medio modificado y una intensidad lumínica alta, aproximadamente  $1,250 \text{ } \mu\text{mol fotonos m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , lo que influyo en que las

productividades sean menores. Xi et al. (2021) reportaron una productividad de biomasa de  $0.42 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  en cultivos con condiciones normales, sin embargo, se diferenció de esta investigación ya que se implementó una intensidad de luz de  $100 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Estos datos son indicativos que el medio Guillard f/2 y los parámetros establecidos, influyen de manera positiva para realizar un cultivo de fase vegetativa en *Dunaliella* sp., ya que los datos se asemejan a las investigaciones de otros autores.

Con respecto a los cambios morfológicos; Gallego et al. (2019) encontraron que *D. salina* a entrar en fase de estrés cambio completamente su morfología de ovoide a circular, además de que la coloración de las células cambió gradualmente de verde a rojo; algo muy similar sucedió en la cepa de la presente investigación, las células cambiaron su morfología de ovoide a circular y un ligero cambio en la coloración como verde amarillento con pequeños glóbulos rojizos. Acevedo et al. (2021) también demuestran los diferentes cambios morfológicos de *D. salina* a condiciones de estrés, en la que las células cambiaron a una forma esférica, y cuando fue sometida a una radiación UV las células presentaron desplazamiento de la membrana plasmática y cambios de coloración. Woyda et al. (2021) indican que en los cloroplastos se concentran la mayor cantidad de  $\beta$ -caroteno en pequeños glóbulos pigmentados de naranja y rojo, lo cual es evidenciado en las Figuras 8 y 9.

En el presente estudio se observó que los contenidos de carotenoides tuvieron mayor impacto en el grupo control “TC - 50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N” con 9.58  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el grupo T2 “800  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N” tuvieron una concentración de 6.81  $\mu\text{g/mL}$ , es decir a medida que se incrementaban las intensidades de luz acompañadas con ausencia de N, el contenido de carotenoides disminuía y de manera significativa. Estos resultados coinciden con los descritos por Xu et al. (2016), quienes evaluaron a *D. salina* a rangos de luz de 50, 200, 500, 1000 y 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , en la que la cepa que evaluó, presento una mayor concentración de carotenoides a la intensidad de luz más baja de 50  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con 0.81  $\text{pg/cell}$ , mientras que los cultivos que estuvieron a 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  presentaron una concentración de 0.53  $\text{pg/cell}$ .

Pereira et al. (2019), evaluaron 3 tipos de luz en *D. salina* y *D. tertiolecta*, con una intensidad de 300  $\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y deficientes de nitrógeno, donde la última presento una situación similar a *Dunaliella* sp. empleada en mi investigación ya que los niveles de carotenoides disminuyeron a medida que pasaban los días a diferencia de *D. salina* que al inicio tenía niveles bajos de carotenoides, pero días posteriores aumento la producción de estos metabolitos. Concluyendo con que la cepa empleada no fue efectiva en la acumulación de pigmentos a regímenes de luz relativamente altos.

Sui et al. (2019) en su investigación cultivaron *D. salina* en dos fases, la primera, los cultivos tuvieron un crecimiento a diferentes concentraciones de nitrógeno representados con (N1 : N6), para la fase dos, un grupo fue suministrado con más fuente de nitrógeno siendo representados como (NN1 : NN6) y el tercer grupo ya no fue suministrado con nitrógeno, y se aumentó la intensidad lumínica, representándose como (NL1 : NL6) con una intensidad de  $110 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$  lo cual fue relativamente más baja a mi investigación; dentro de sus resultados los grupos con una mejor producción de carotenoides, fueron las de grupo NL “NL3 y NL4”, algo similar al grupo control de mi investigación, en la que los cultivos iniciales estuvieron con nutrientes suficientes para producir biomasa sin embargo después de su fase vegetativa siguieron a las mismas condiciones con el detalle que no fueron suministrados con más nitrógeno, por lo que la investigación que se está comparando la intensidad lumínica no fue un cambio brusco para *D. salina* por lo que el factor que más influyó en la concentración de carotenoides, fue el nitrógeno y un ligero aumento de luz; si se realizan cambios bruscos de luz lo que podría ser afectar a las células y con ello causar fotoxidación de los carotenoides.

Estudios como el de Nguyen et al. (2016), en el que evaluaron 3 cepas de *Dunaliella* en intensidades de luz de  $800 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$  y  $50 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$  con distintos fotoperiodos 3:1, 3 días a  $800 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$  y un día a  $50 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$ ; el segundo fotoperiodo fue 1:3 un día a  $800 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$  y tres días a  $50 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$ , y finalmente cultivos a  $800 \mu\text{mol fotones } m^{-2} s^{-1}$ .

$\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  constantes, encontrando que *D. salina* A9 fue una cepa no carotenogénica con respecto a las 2 cepas que también fueron evaluadas, ya que tanto el control, como a los fotoperiodos produjo concentraciones relativamente bajas con respecto a las 2 cepas que también fueron evaluadas. Lo que nos da la teoría de que la cepa empleada en mi investigación al ser silvestre y no estar identificada como especie su respuesta a los factores de estrés no siguen los patrones de cepas ya clasificadas como *D. salina*.

Si bien es cierto, los niveles de clorofilas en los grupos T1, T2 y TC que básicamente estuvieron sometidos a estrés, disminuyeron, a comparación del grupo vegetativo TV que se cultivó a condiciones normales y presentó niveles de clorofilas más altos; pudo haber estado influenciado por los niveles de nitrógeno en los medios, como lo explica Li et al (2008), quien planteó la hipótesis que cuando los niveles de nitrógeno son consumidos en el medio, las clorofilas son usadas por las microalgas como sustitutos de esta fuente que ha sido agotada, para seguir realizando sus procesos fisiológicos como división celular. Lo cual también es corroborado en la investigación de Lai et al. (2019), quien evaluó a *D. viridis* en medios con diferentes concentraciones de nitrógenos, mientras los niveles de N fueron menores, también se redujeron los contenidos de clorofilas, por ejemplo, *D. viridis* cultivada a una intensidad de  $600 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con una concentración baja de nitrógeno presentó una pérdida de dicho pigmento, lo que también sucedió en la presente investigación, donde los tratamientos T1 y T2 tuvieron niveles bajos de clorofilas, seguido del grupo control que también estuvo deficiente de nitrógeno, pero al tener

las condiciones de luz adecuadas no afecto en gran medida a su procesos de división celular, pero si al contenido de clorofilas debido a que no fue suministrada de N.

Con respecto a las concentraciones de  $\beta$ -caroteno. Morales et al. (2020b) reporto una concentración de  $\beta$ -caroteno de  $6.9 \pm 0.99 \text{ mg L}^{-1}$  en *D. tectiolecta* a una intensidad lumínica de  $274 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con una salinidad de 35 UPS y empleando medio f/8 con una concentración de  $18.75 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  lo cual es relativamente bajo; dicha concentración no se aleja a lo reportado en grupo T1 de mi experimentación con una intensidad lumínica de  $500 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con deficiencia de N, alcanzando una concentración de  $8.79 \text{ mg de } \beta\text{-caroteno / gr}$ . Por otro lado, Joseph et al (2022), experimento con 2 cepas de *Dunaliella* (*D. salina* y *Dunaliella* sp.) sometidas a regímenes de luz de 100, 200, 500 y 1000  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , de los cuales las cepas cultivadas con el rango de luz más alto, obtuvieron los mejores resultados con respecto al contenido de  $\beta$ -caroteno, sin embargo, *D. salina* fue la especie que más producción tuvo de este metabolito a diferencia de *Dunaliella* sp. en todos los casos, deduciendo que la concentración de metabolitos de interés, dependerá de gran medida a la adaptación de las microalgas a las condiciones.

Un caso similar, fue lo reportado por Y. Xu et al. (2018), quien evaluó 5 cepas de *Dunaliella* a regímenes de luz de 200, 500, 1000 y 1500  $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  para la producción de  $\beta$ -caroteno, en la que las cepas DF40, CCAP 19/30, DF17

fueron las que menos producción de  $\beta$ -caroteno presentaron a medida que se incrementaban las intensidades lumínicas, cabe mencionar que la cepa CCAP 19/30 fue identificada como *D. salina*, lo cual es muy interesante, ya que se supone que son las especies que más producen  $\beta$ -caroteno.

Por otro lado, Xi et al. (2021) en sus resultados demuestra una mayor eficiencia en cultivos con intensidades de luz altas y también en cultivos deficientes de nitrógeno, sin embargo, en mi investigación lo que más influyó sería la deficiencia de nitrógeno, como sucedió en el grupo control, que se mantuvo a condiciones de luz normales a las de cultivos vegetativos, pero estuvo deficiente de nitrógeno. Lo que da a deducir que cada cepa se adapta de maneras muy diferentes, por lo tanto, la cepa empleada en la presente investigación no tolera rangos de luz extremos, o quizá deban probarse fuentes de luz que lleguen a rangos altos pero que no generen calor, quizás así y acompañado con deficiencia de nitrógeno se pueda obtener una concentración de carotenoides mucho mayor a las ya presentadas.

Xi et al. (2020) evaluó a *D. salina* en regímenes de luz elevados, de las cuales 2 se asemejaban a los rangos de luz de la presente investigación, sin embargo, dentro de los resultados de la investigación en comparación, a una intensidad de luz de 660 y 1000  $\mu\text{mol fotonos m}^{-2} \text{s}^{-1}$  tuvieron concentraciones más bajas a diferencia de los demás regímenes de luz, lo que al igual de las demás investigaciones ya mencionadas, la capacidad de la microalga para producir  $\beta$ -caroteno dependerá en

gran medida a sus adaptaciones a las condiciones de estrés, donde ciertas cepas son capaces de tolerar las condiciones extremas, como existen cepas que no toleran estrés fuertes.

El presente estudio evaluó la capacidad de *Dunaliella* sp. para producir  $\beta$ -caroteno en condiciones de estrés por alta intensidad lumínica acompañada con deficiencia de N, para lo cual la cepa si produce estos metabolitos pero concentraciones bajas que no son convenientes, debido a que las condiciones experimentales fueron extremadamente fuertes para la cepa, lo cual es evidenciado en otros estudios donde incluso cepas de *D. salina* no son capaces de inducir un proceso de carotenogénesis efectivo, y esto se deduce a que es por las adaptaciones que presentan las diferentes especies a las condiciones de cultivo estresantes. Hasta el momento *Dunaliella* sp. fue capaz de producir carotenoides y  $\beta$ -caroteno en condiciones con deficiencia de nitrógeno, como lo fue el grupo control (TC) con  $41.15 \pm 0.08$  mg de  $\beta$ -caroteno por g de muestra, aunque las concentraciones de este metabolito no se alejan mucho con respecto a los cultivos vegetativos; además de que en los análisis de carotenoides se realizaron con un solvente que quizás no fue químicamente puro, ya que los resultados fueron menores con respecto al  $\beta$ -caroteno.

## CONCLUSIONES

Los cultivos de *Dunaliella* sp. en medio Guillard f/2 demostraron ser eficientes con respecto a la productividad de biomasa, densidad celular y tasa de crecimiento, por lo que es replicable a las condiciones propuestas. Fue necesario cosechar el grupo vegetativo “TV” con la finalidad de que sirva como control positivo y evaluar el contenido de pigmentos con los grupos que pasaron a estrés lumínico acompañado con deficiencia de N, como T1, T2 y TC que solo estuvo sometido a deficiencia de nitrógeno; cuando los cultivos pasaron a fase de estrés hubo cambios morfológicos notables, los cuales se asemejan a los ya reportados por otros autores.

Con respecto a los análisis de pigmentos como clorofilas y carotenoides, se pudo apreciar que los grupos con mayor eficiencia en la producción de carotenoides fueron en primer lugar el grupo control “TC”, seguido del grupo vegetativo “TV”, que presentaron datos que fueron mejores con respecto a los grupos que pasaron a estrés lumínico acompañados con deficientes de nitrógeno T1 y T2. Lo que da indicio que *Dunaliella* sp. es una especie que no tolera procesos de estrés con intensidades relativamente altas y acompañadas con deficiencia de nitrógeno provocando que las células presenten muerte celular y degradación de pigmentos con gran rapidez; sin embargo, la cepa produce metabolitos de interés en cultivos deficientes de nitrógeno con intensidad lumínica baja o normal para un crecimiento vegetativo, como el grupo control TC, mientras que las condiciones propuestas no favorecen a producir concentraciones altas de pigmentos de interés.

En los resultados de  $\beta$ -caroteno, al igual que los carotenoides, las condiciones de estrés propuestas no benefician a la producción de este metabolito secundario, ya que el mejor tratamiento para producir este  $\beta$ -caroteno, fue el control “TC” con una concentración de  $41.15 \pm 0.08$  mg/gr, seguido del grupo vegetativo con una concentración de  $33.47 \pm 0.02$  mg/gr, mientras que los grupos que experimentaron estrés T1 y T2 presentaron concentraciones relativamente bajas ( $8.96 \pm 0.16$  mg/gr y  $5.74 \pm 0.52$  mg/g respectivamente); lo que indica que la cepa en estudio produce metabolitos de interés bajo condiciones de estrés extremos pero en concentraciones muy bajas, lo que es indicativo que la cepa bajo las condiciones evaluadas sufre daños morfológicos y fisiológicos que no son convenientes. Quizás *Dunaliella* sp. sí es capaz producir  $\beta$ -caroteno en condiciones de luz mayores a los adecuados de un cultivo vegetativo, pero con menores rangos a los ya ejecutados en esta investigación.

## RECOMENDACIONES

Se propone evaluar la producción de  $\beta$ -caroteno en rangos de luz más bajos, ya que los propuestos fueron extremadamente fuertes para la cepa en estudio; además de probar nuevas fuentes de luz, como investigaciones que aplican luces rojas, azules, uv, etc. Además de evaluar la cepa en estudio con otros medios de cultivos.

Considerar que lo que influyo en la producción de metabolitos fue la deficiencia de nitrógeno con una intensidad de luz normal de cultivos vegetativos, por lo que se recomienda evaluar cultivos con diferentes niveles de nitrógeno.

En los cromatogramas de los anexos 15 y 16 correspondientes a los grupos de estrés T2 y T1 respectivamente se manifestaron picos cromatográficos mayores a los de  $\beta$ -caroteno en un tiempo de retención de 1.6 min aproximadamente, lo que da indicio que la cepa podría estar produciendo otro metabolito, en el que en un TR de 1.63 se ha identificado a la luteína; sin embargo, los cromatogramas muestran otros picos en un TR de 1.8 los cuales no se han identificado aún, por lo que se recomienda ampliar los análisis en HPLC para la identificación de otros metabolitos que también sean de interés.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S., Jacob, D., Al-Shamali, M., & Ahmed, N. (2010). Induction and extraction of  $\beta$ -carotene from the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Utiln.* <http://jalgalbiomass.com/paper3vol1no4.pdf>
- Acevedo, H. E. H., Ramos, L. F., Cifuentes, F. V., Soto, A. R., & Samanamud, C. P. A. (2021). Characterization and production potential of carotenes in Peruvian strains of *Dunaliella salina* Teodoresco. *Journal Of The World Aquaculture Society*, 53(3), 765-780. <https://doi.org/10.1111/jwas.12859>
- Álvarez, R., Vaz, B., Gronemeyer, H., de Lera, Á. R. (2014). Functions, therapeutic applications, and synthesis of retinoids and carotenoids. *Chemical Reviews*, 114: 1–125. <https://doi.org/10.1021/cr400126u>
- Alvear, M., C. Castillo, & D. Henao. 2011. Evaluación del Ph y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas *Dunaliella salina* y *Chlorella* nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel. Tesis de grado para la obtención del título Ingeniero Químico. Universidad de Cartagena. Colombia
- Amante C., & Eakins B.W. (2009). ETOPO1 1 Arc-Minute Global Relief Model: Procedures, Data Sources and Analysis. NOAA National Geophysical Data Center, Boulder, 2009. P: 4
- Apandi, N. M., Muhamad, M. S., Mohamed, R. M. S. R., Sunar, N. M., Al-Gheethi, A., Gani, P., & Rahman, F. A. (2021). Optimizing of Microalgae *Scenedesmus* sp. Biomass Production in Wet Market Wastewater Using

Response Surface Methodology. *Sustainability*, 13(4), 2216.  
<https://doi.org/10.3390/su13042216>

Arredondo-Vega, B.O., & Voltolina, D. (2007). Determinación de pigmentos por espectrofotometría. *Métodos y Herramientas analíticas en la evaluación de biomasa microalgal*. Editado por Bertha Olivia Arredondo Vega y Domenico Voltolina. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, cap. 7, p. 64-67.

Arredondo-Vega, B. O., Voltolina, D., Zenteno-Savín, T., Arce-Montoya, M., & Gómez-Anduro, G. A. (2017). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. 2ª Edición. Editado por Bertha Olivia Arredondo Vega y Freddy Hernández Uribe, Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste.

Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga *Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 4(1), 99-120.  
<https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2222318>

Ben-Amotz, A. (1995) New mode of *Dunaliella* biotechnology: two-phase growth for b-carotene production. *J Appl Phycol* 7, 65–68.

Ben-Amotz, A., Lers, A. and Avron, M. (1988) Stereoisomers of b-carotene and phytoene in alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol* 86, 1286–1291.

Benhima, R., El Arroussi, H., Kadmiri, I. M., El Mernissi, N., Wahby, I., & Bendaou, N. (2018). Nitrate reductase inhibition induces lipid enhancement

- of *Dunaliella tertiolecta* for biodiesel production. *Scientific World Journal*, 2018, 1–8. doi:10.1155/2018/6834725
- Bogacz-Radomska, L., & Harasym, J. (2018b).  $\beta$ -Carotene—properties and production methods. *Food Quality And Safety*, 2(2), 69-74. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy004>
- Boual, Z., & Guehaz, K. (2018). *Study of microalgal diversity in two systems: open (Lake) and closed (Irrigation basin) in Ouargla- Algeria*. <http://dspace.univ-ouargla.dz/jspui/handle/123456789/18744>
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Avsiyan, A. L., Memetshaeva, N. o. A., Lelekov, A. S., & Novikova, T. M. (2019). Production Characteristics of *Dunaliella salina* at Two-phase Pilot Cultivation (Crimea). *Turkish Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences*, 20(5). [https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20\\_5\\_08](https://doi.org/10.4194/1303-2712-v20_5_08)
- Borovkov, A. B., Gudvilovich, I. N., Avsiyan, A. L., Lantushenko, A. O., Rylkova, O. A., Memetshaeva, O. A., Degtyar, I. V., & Chekushkin, A. A. (2021). Productivity and morphometric parameters of the microalga *Dunaliella salina* IBSS-2 under pilot cultivation in continental mid-latitude climate in spring. *3 Biotech*, 11(10). <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02982-7>
- Borowitzka, M. A., & Siva, C. J. (2007). The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *Journal of Applied Phycology*, 19, 567–590. doi:10.1007/s10811-007-9171-x

- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1988) Algal growth media sources of algal culture. In *Micro-algal Biotechnology*. ed. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. pp. 465–465. New York: Cambridge University Press.
- Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (1987) Limits to growth and carotenogenesis in laboratory and large-scale outdoors of *Dunalella salina*. In *Algal Biotechnology*. ed. Stadler, T., Molhan, J., Verdus, M.C., Karamanos, Y. and Morvan, H.D. pp. 345–402. London: Elsevier Applied Science.
- Britton, G. (2020). Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular And Cell Biology Of Lipids*, 1865(11), 158699. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158699>
- Chatragadda, R., & Dufossé, L. (2021). Ecological and Biotechnological Aspects of Pigmented Microbes: A Way Forward in Development of Food and Pharmaceutical Grade Pigments. *Microorganisms*, 9(3), 637. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030637>
- Chew, K. W., Yap, J. Y., Show, P. L., Suan, N. H., Juan, J. C., Ling, T. C., Lee, D., & Chang, J. (2017). Microalgae biorefinery: High value products perspectives. *Bioresource Technology*, 229, 53-62. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.006>
- Chow, Y. Y. S., Goh, S. J. M., Su, Z., Ng, D. H. P., Lim, C. Y. ... Lee, Y. K. (2013). Continual production of glycerol from carbon dioxide by *Dunaliella*

tertiolecta. *Bioresource Technology*, 136, 550–555.  
doi:10.1016/j.biortech.2013.03.040

Colusse, G. A., Mendes, C. R. B., Duarte, M. E. R., De Carvalho, J. C., & Nosedá, M. D. (2020). Effects of different culture media on physiological features and laboratory scale production cost of *Dunaliella salina*. *Biotechnology Reports*, 27, e00508. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00508>

Combe C, Hartmann P, Rabouille S, Talec A, Bernard O, Sciandra A (2015) Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. *Biotechnol Bioeng* 112:1111–1121

Da Silva, M. R. o. B., Moura, Y. A. S., Converti, A., Porto, A. L. F., De Araújo Viana Marques, D., & Bezerra, R. P. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. *Algal Research*, 58, 102396. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>

Dunal, F. (1838). Extrait d'un mémoire sur les algues qui colorent en rouge certains eaux des marais salants méditerranéens. *Ann Sc Nat Bot Sér*, 18, 172.

El-Baz, F. K., Aly, H. F., & Abd-Alla, H. I. (2019). The ameliorating effect of carotenoid rich fraction extracted from *Dunaliella salina* microalga against inflammation- associated cardiac dysfunction in obese rats. *Toxicology Reports*, 7, 118-124. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.12.008>

- García-Romeral, J., Pavía-Gómez, M., Sanz, T. G., Chirivella-Martorell, J., & Serrano-Aroca, Á. (2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *NEREIS*, 9, 115-130. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6041049.pdf>
- Graziano, R. (2014). Carotenoids and Cardiovascular Disease. En Brar, S. K., Kaur, S., & Dhillon, G. S. (Ed), *Nutraceuticals and Functional Foods: Natural Remedy* (pp. 79-91). Nova Science Publishers, Inc.
- González, M. A., Gómez, P. I., & Polle, J. E. (2019). Taxonomy and phylogeny of the genus *Dunaliella*. In *The Alga Dunaliella* (pp. 15-44). CRC Press.
- Guamán-Burneo, M. C. (2019). *Evaluación del Potencial Antioxidante de Microalgas Aisladas de Sistemas Lacustres de Áreas Protegidas y Conservadas del Ecuador*. (Título de Ingeniera en Biotecnología, Universidad de las Américas). Repositorio Institucional UDLA. <https://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/11811/1/UDLA-EC-TIB-2019-34.pdf>
- Guevara, M., Vivenes, E. Z., León, M., & Acosta, M. (2019). Actividad antioxidante de un aceite vegetal enriquecido con la microalga cultivada *Dunaliella salina* (Chlorophyceae). *AquaTechnica Revista Iberoamericana de Acuicultura*, 1(1), 40. <https://doi.org/10.33936/at.v1i1.2150>

- Gómez, P. I., & González, M. A. (2005). *The effect of light and nitrogen on carotenoid production in Dunaliella salina*. *Revista Chilena de Historia Natural*.
- Guillard, R.R. and Ryther, J.H. (1962) Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol* 8, 229–239.
- Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. En: *Handbook of Phycological Methods*. Stein, J. R. (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 289-312 pp.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. En *Springer eBooks* (pp. 29-60). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8714-9_3)
- Guevara, M.; Pinto, R.; Villaroel, J.; Hernández, E.; Díaz, R.; Gotera, B.; & Cortez, R. (2016). INFLUENCIA DE LA SALINIDAD Y LA IRRADIANCIA SOBRE EL CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE UNA NUEVA CEPA DE *Dunaliella salina*, PROVENIENTE DE LAS SALINAS DE ARAYA, VENEZUELA. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, vol. 28, núm. 3, pp. 494-501, 201.
- Hirschberg, J. (2001). Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Current Opinion In Plant Biology*, 4(3), 210-218. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(00)00163-1)

- Joseph, S., Ramadoss, D., & Chellandi, M. (2022). Photoinhibition and  $\beta$ -carotene production from *Dunaliella* sp. isolated from salt pans of Goa. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-14.
- Kevin, N., & Widjaja, A. (2022). Effect of Nitrogen Deficiency and UV Light on *Dunaliella salina*  $\beta$  carotene Production. *Advances In Biological Sciences Research/Advances In Biological Sciences Research*. [https://doi.org/10.2991/978-94-6463-086-2\\_15](https://doi.org/10.2991/978-94-6463-086-2_15)
- Kimura, M., Kobori, C. N., Rodriguez-Amaya, D. B., & Nestel, P. (2005). Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. *Food Chemistry*, 100(4), 1734-1746. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.020>
- Kitto, M. R., & Resinald, M. (2011). Effect of summer/winter light intensity and salt on growth kinetics and beta carotene accumulation by *Dunaliella* in open outdoor earthen ponds in a desert island, off UAE coast. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 2, 14–21
- Lai, Y., Karam, A. L., Sederoff, H. W., Ducoste, J. J., & De los Reyes, F. L. (2019). Relating nitrogen concentration and light intensity to the growth and lipid accumulation of *Dunaliella viridis* in a photobioreactor. *Journal Of Applied Phycology*, 31(6), 3397-3409. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01897-4>
- Lamers, P. P., Janssen, M., De Vos, R. C., Bino, R. J., & Wijffels, R. H. (2008). Exploring and exploiting carotenoid accumulation in *Dunaliella salina* for

cell-factory applications. *Trends In Biotechnology*, 26(11), 631-638.  
<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.07.002>

Leite, G.B.; & Hallenbeck, P.C. (2012). Algae Oil. In: *Microbial Technologies in Advanced Biofuels Production*. Springer New York Dordrecht Heidelberg, London. P: 233.

Li, Y., Horsman, M., Wang, B., Wu, N., & Lan, C. Q. (2008). Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 81(4), 629-636.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1681-1>

Li, Z., M. Sun, Q. Li, A. Li and C. Zhang (2012). Profiling of carotenoid in Six microalgae (*Eustigmatophyceae*) and assessment of Meir beta- carotene productions in bubble column photo bioreactor. *Biotechnol. let.*, 34(11): 2049-53.

Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols In Food Analytical*  
<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>

Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Garcia-Perez, P., Carreira-Casais, A., Silva, A., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. (2022). A HPLC-DAD method for identifying and estimating the content of fucoxanthin,  $\beta$ -carotene and chlorophyll a in brown algal extracts. *Food Chemistry Advances*, 1, 100095.  
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100095>

- Lu, H., Wang, J., & Yuan, W. (2024). Illumination Effects on Bacteriorhodopsin Accumulation in Archaeon Halobacterium Halobium. *Journal of the ASABE*, 67(3), 525–531. <https://doi.org/10.13031/JA.15349>
- Macias-Sánchez, M., Mantell, C., Rodriguez, M., Martinezdelaossa, E., Lubian, L., & Montero, O. (2008). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77(3), 948-952. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.032>
- Mahmood, S., Azeem, M., Javed, S., Afzal, B., & Zia-Ul-Haq, M. (2021). Analysis of Carotenoids. En *Springer eBooks* (pp. 317-392). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_9)
- Mclachlan, J. and Yentsch, C.S. (1959) Observations on the growth of *Dunaliella euchlora* in culture. *Biol Bull (Woods Hole)* 116, 461–471.
- Mclachlan, J. (1973) Growth-media-marine. In *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurement* ed. Stein, J.R. pp. 25–51. London: Cambridge University Press.
- Morales, J. G., Elías, J. A. L., Félix, D. M., Lagunas, N. G., & Olivarría, D. F. (2020). Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de  $\beta$ -caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*//Effect of nitrogen and salinity stress on the  $\beta$ -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *BIOTecnia*, 22(2), 13-19. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1241>

- Moslemipetroudi, M., Shariati, F. P., Amrei, H. D., & Nasab, A. H. (2020). The effect of different light spectra on beta-carotene production by *Dunaliella salina*. *Iranian Journal Of Chemistry & Chemical Engineering-international English Edition*.  
<https://doi.org/10.30492/ijcce.2020.107720.3583>
- Moura, Y. A. S., De Araújo Viana-Marques, D., Porto, A. L. F., Bezerra, R. P., & Converti, A. (2020). Pigments Production, Growth Kinetics, and Bioenergetic Patterns in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) in Response to Different Culture Media. *Energies*, *13*(20), 5347.  
<https://doi.org/10.3390/en13205347>
- Nguyen, A., Tran, D., Ho, M., Louime, C., Tran, H., & Tran, D. (2016). High Light Stress Regimen on *Dunaliella Salina* Strains For Carotenoids Induction. *Integrative Food Nutrition And Metabolism*, *3*(4).  
<https://doi.org/10.15761/ifnm.1000158>
- Oren, A. (2005). A hundred years of *Dunaliella* research: 1905–2005. *Saline Systems*, *1*(1). <https://doi.org/10.1186/1746-1448-1-2>
- Osram, S. (2000). Photosynthetically Active Radiation (PAR) Units. National Customer Support Center.
- Pereira, S., Otero, A., Pereira, S., & Otero, A. (2019). Effect of light quality on carotenogenic and non-carotenogenic species of the genus *Dunaliella* under nitrogen deficiency. *Algal Research*, *44*, 101725.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101725>

- Qin, R., Li, Y., Zhang, L., & Liu, J. (2021). The effect of salinity shock on the growth and rapid light curve of *dunaliella salina*. *Aquaculture Research*, 52(6), 2569-2579. <https://doi.org/10.1111/are.15105>
- Raja, R., Iswarya, S. H., Balasubramanyam, D., & Rengasamy, R. (2007). PCR-identification of *Dunaliella salina* (Volvocales, Chlorophyta) and its growth characteristics. *Microbiological Research*, 162(2), 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.03.006>
- Reshma, R., Chitra Devi, K., Dinesh Kumar, S., Santhanam, P., Perumal, P., Krishnaveni, N., Begum, A., Pragnya, M., Arthikha, R., Dhanalakshmi, B., & Kim, M. K. (2021). Mejora de la producción de pigmentos en la microalga verde *Dunaliella salina* (PSBDU05) bajo condiciones de cultivo optimizadas. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100672. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100672>
- Riaz, M., Zia-Ul-Haq, M., & Dou, D. (2021). Chemistry of Carotenoids. En *Springer eBooks* (pp. 43-76). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_2)
- Ross, A.C.; Zolfaghari, R; Weisz, J. (2001). Vitamin A: recent advances in the biotransformation, transport, and metabolism of retinoids. *Curr. Opin. Gastroenterol*; 17:184–192.
- Rowland, Steven M., Stefanie Van Wychen, and Lieve M. L. Laurens. (2022). Identification and Quantification of Photosynthetic Pigments in Algae. Laboratory Analytical Procedure (LAP), Issue Date: October 27, 2022.

Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-5100-84170.

Saubenova, M., Rapoport, A., Venkatachalam, M., Dufossé, L., Yermekbay, Z., & Oleinikova, Y. (2024). Production of Carotenoids by Microorganisms. *Fermentation*, *10*(10), 502. <https://doi.org/10.3390/fermentation10100502>

Shaish, A., Harari, A., Hananshvili, L., Cohen, H., Bitzur, R., Luvish, T., Ulman, E., Golan, M., Ben-Amotz, A., Gavish, D., Rotstein, Z., & Harats, D. (2006). 9-cis  $\beta$ -carotene-rich powder of the alga *Dunaliella bardawil* increases plasma HDL-cholesterol in fibrate-treated patients. *Atherosclerosis*, *189*(1), 215-221. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.12.004>

Sluiman, H. (2009). Phycology (4th edition). Robert Edward Lee. *Edinburgh Journal Of Botany*, *66*(3), 483-484. <https://doi.org/10.1017/s0960428609990072>

Souza, P. O., Ferreira, L. R., Pires, N. R. X., Filho, P. J. S., Duarte, F. A., Pereira, C. M. P., & Mesko, M. F. (2012). Algae of economic importance that accumulate cadmium and lead: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, *22*(4), 825-837. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2012005000076>

Sui, Y., Muys, M., Van de Waal, D. B., D'Adamo, S., Vermeir, P., Fernandes, T. V., & Vlaeminck, S. E. (2019). Enhancement of co-production of nutritional protein and carotenoids in *Dunaliella salina* using a two-phase cultivation

- assisted by nitrogen level and light intensity. *Bioresource Technology*, 287, 121398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121398>
- Tafreshi, A. H., & Shariati, M. (2009). Dunaliellabiotechnology: methods and applications. *Journal Of Applied Microbiology*, 107(1), 14-35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x>
- Takagi, M., Karseno & T. Yoshida. 2006. Effect of salt concentration on intracellular accumulation of lipids and triacylglyceride in marine microalgae *Dunaliella* Cells. *Journal of Bioscience and bioengineering*. 101(3): 223-226. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.223>
- Teodoresco, E. (1905). Organisation et développement du *Dunaliella*, nouveau genre de Volvocacée-Polyblepharidée. *Beih Z Bot Centralbl*, 18, 215–232.
- Urnau, L., Colet, R., Reato, P. T., De Medeiros Burkert, J. F., Rodrigues, E., Gomes, R., Jacques, R. A., Valduga, E., & Steffens, C. (2019). Use of Low-Cost Agro-Industrial Substrate to Obtain Carotenoids from *Phaffia rhodozyma* in a Bioreactor. *Industrial Biotechnology*, 15(1), 25-34. <https://doi.org/10.1089/ind.2018.0027>
- Vela-García, N., Guamán-Burneo, M. C., & González-Romero, N. P. (2019). BIORREMEDIACIÓN EFICIENTE DE EFLUENTES METALÚRGICOS MEDIANTE EL USO DE MICROALGAS DE LA AMAZONÍA y LOS ANDES DEL ECUADOR. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 917-929. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.04.11>

- Vigani, M., Parisi, C., Rodríguez-Cerezo, E., Barbosa, M. J., Sijtsma, L., Ploeg, M., & Enzing, C. (2015). Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends In Food Science & Technology*, 42(1), 81-92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
- Wang, B. Lin, L. Lu and W. Chen (2012). Optimization of B carotene production by a newly isolated *Serratia marcescens* strain. *Electron. J. Biotech*, 15(6): 1-3.
- Wegmann, K., Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980) The effect of temperature on glycerol retention in the halotolerant algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. *Plant Physiol* 66, 1196 1197.
- Wijffels, R. H., Kruse, O., & Hellingwerf, K. J. (2013). Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Current Opinion In Biotechnology*, 24(3), 405-413. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.04.004>
- Wongsansilp, T., Yokthongwattana, K., Roytrakul, S., & Juntawong, N. (2019).  $\beta$ -carotene Production of UV-C Induced *Dunaliella salina* Under Salt Stress. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 13(1), 193-200. <https://doi.org/10.22207/jpam.13.1.20>
- Woyda-Ploszczyca, A. M., & Rybak, A. S. (2021). How can the commercial potential of microalgae from the *Dunaliella* genus be improved? The importance of nucleotide metabolism with a focus on nucleoside

- diphosphate kinase (NDPK). *Algal Research*, 60, 102474.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102474>
- Wright, S., & Burton, H. (1981). The biology of Antarctic saline lakes. *Hydrobiologia*, 82, 319–338. doi:10.1007/BF00048723
- Wu, Z., Akter, R., Arirob, W., Juntawong, N., Ma, C., & Duangmanee, P. (2015). Effects of light intensity and the remaining nitrate concentration on the beta-carotene accumulation of a wild *Dunaliella salina* strain isolated from the saline soil. *Microbiology Research*, 6(1).  
<https://doi.org/10.4081/mr.2015.6233>
- Xi Y, Kong F and Chi Z (2021) ROS Induce  $\beta$ -Carotene Biosynthesis Caused by Changes of Photosynthesis Efficiency and Energy Metabolism in *Dunaliella salina* Under Stress Conditions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:613768. doi: 10.3389/fbioe.2020.613768
- Xi, Y., Wang, J., Chu, Y., Chi, Z., & Xue, S. (2020). Effects of different light regimes on *Dunaliella salina* growth and  $\beta$ -carotene accumulation. *Algal Research*, 52, 102111. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102111>
- Xu, Y., Ibrahim, I. M., & Harvey, P. J. (2016). The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiology And Biochemistry*, 106, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.021>
- Xu, L., Gao, F., Feng, J., Lv, J., Liu, Q., Nan, F., Liu, X., & Xie, S. (2021). Relationship between  $\beta$ -Carotene Accumulation and Geranylgeranyl

Pyrophosphate Synthase in Different Species of *Dunaliella*. *Plants*, 11(1), 27. <https://doi.org/10.3390/plants11010027>

Yan, C., Fan, J., & Xu, C. (2013). Analysis of Oil Droplets in Microalgae. *Methods In Cell Biology*, 71-82. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-408051-5.00005-x>

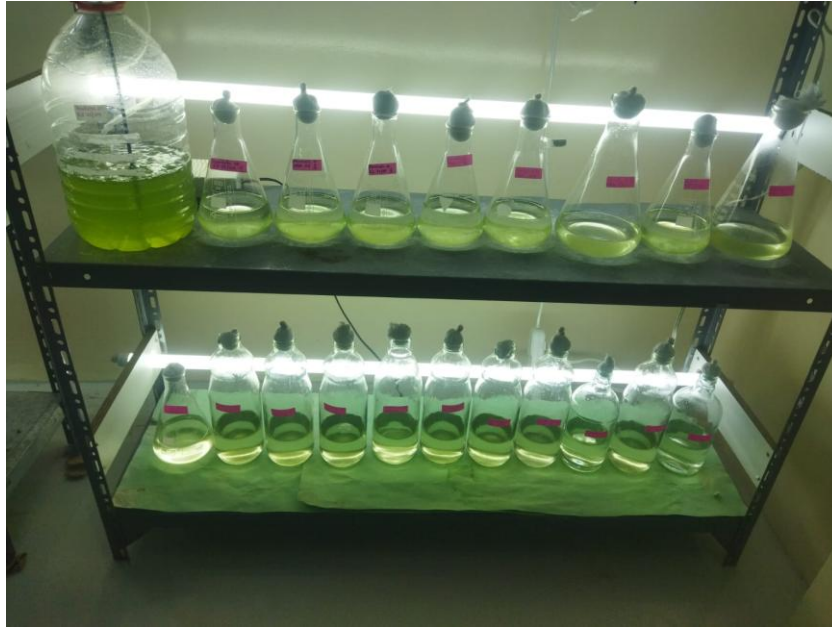
Ye, Z., Jiang, J., & Wu, G. (2008). Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotechnology Advances*, 26(4), 352-360. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.004>

Zafar, J., Aqeel, A., Shah, F. I., Ehsan, N., Gohar, U. F., Moga, M. A., Festila, D., Ciurea, C., Irimie, M., & Chicea, R. (2021). Biochemical and Immunological implications of Lutein and Zeaxanthin. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(20), 10910. <https://doi.org/10.3390/ijms222010910>

Zia-Ul-Haq, M. (2021). Historical and Introductory Aspects of Carotenoids. En *Springer eBooks* (pp. 1-42). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-46459-2_1)

## ANEXOS

**Anexo 1.** Cultivos iniciales de 300 mL.



**Anexo 2.** Día 0 de estrés, izquierda grupo T1, Derecha grupo T2.



**Anexo 3.** Cosecha de biomasa.



**Anexo 4.** Día 7 de estrés del grupo T2 "800  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N".



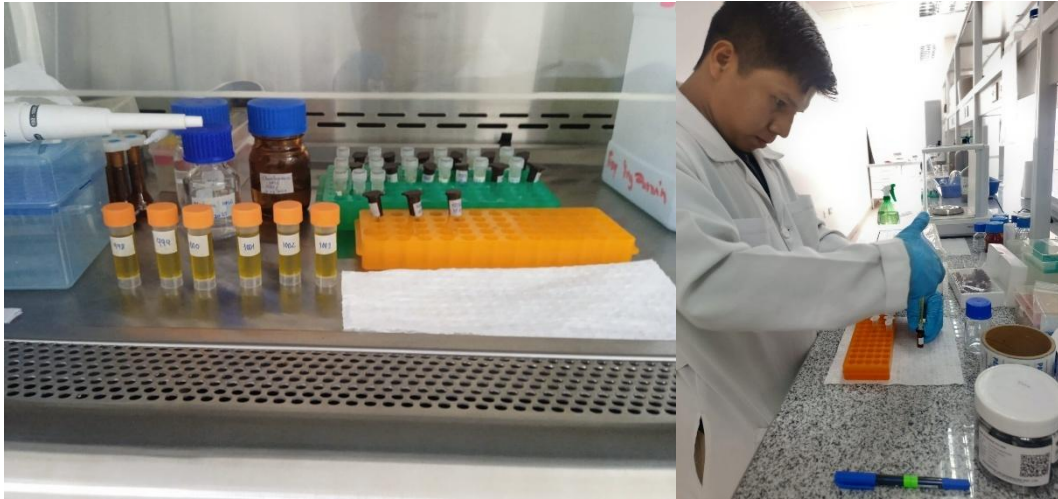
**Anexo 5.** Extracción de carotenoides con Metanol.



**Anexo 12.** Control de parámetros físicos.



**Anexo 7.** Extracción y preparación de muestras para análisis en HPLC.



**Anexo 8.** Cromatografía Líquida de Alta Resolución "HPLC".



Anexo 9. Estadística de curva de crecimiento.

### Shapiro-Wilk normality test

data: residuals(modelo\_aov\_corregido)  
W = 0.87785, p-value = 0.0005426

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)

group	Df	F value	Pr(>F)
2	36	0.0258	0.9745

Kruskal-Wallis rank sum test

data: Conteo by Muestra  
Kruskal-Wallis chi-squared = 0.018088, df = 2, p-value = 0.991

Anexo 10. Estadística de carotenoides.

```

> print(estadistica_descriptiva)
# A tibble: 4 × 5
  T      variable      n mean  sd
<fct> <fct>      <dbl> <dbl> <dbl>
1 T1  Concentracion    6  7.83 0.121
2 T2  Concentracion    6  6.81 0.059
3 TC  Concentracion    6  9.58 0.515
4 TV  Concentracion    6  7.33 0.084

+ shapiro_test(Concentracion)
>
> print(prueba_normalidad)
# A tibble: 4 × 4
  T      variable      statistic      p
<fct> <chr>      <dbl> <dbl>
1 T1  Concentracion    0.716 0.00903
2 T2  Concentracion    0.813 0.0763
3 TC  Concentracion    0.691 0.00491
4 TV  Concentracion    0.724 0.0111

+ levene_test(Concentracion ~ T)
>
> print(prueba_homogeneidad)
# A tibble: 1 × 4
  df1  df2 statistic      p
<int> <int> <dbl> <dbl>
1    3   20  4144. 4.22e-28

> print(prueba_kw)
# A tibble: 1 × 6
  .y.      n statistic  df      p method
* <chr> <int> <dbl> <int> <dbl> <chr>
1 Concentracion 24 21.7 3 0.0000765 Kruskal-Wallis

> print(dum_test_resultados)
# A tibble: 6 × 9
  .y.      group1 group2  n1  n2 statistic      p      p.adj p.adj.signif
* <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 Concentracion T1  T2    6  6  -2.94 0.00324 0.0194 *
2 Concentracion T1  TC    6  6  1.47 0.141 0.846 ns
3 Concentracion T1  TV    6  6  -1.47 0.141 0.846 ns
4 Concentracion T2  TC    6  6  4.42 0.0000101 0.0000604 ****
5 Concentracion T2  TV    6  6  1.47 0.141 0.846 ns
6 Concentracion TC  TV    6  6  -2.94 0.00324 0.0194 *

```

Anexo 11. Estadística de Clorofila a

```
> print(estadistica_descriptiva)
# A tibble: 4 × 4
  Grupo N Media DE
  <fct> <int> <dbl> <dbl>
1 T1     6 1.27 0.0862
2 T2     6 1.44 0.00753
3 TC     6 2.11 0.00753
4 TV     6 2.94 0.0138
```

```
[1] "--- RESULTADOS PRUEBA DE NORMALIDAD (SHAPIRO-WILK)
> print(normalidad_test)
# A tibble: 4 × 4
  Grupo variable statistic p
  <fct> <chr> <dbl> <dbl>
1 T1 Clorofila_a 0.747 0.0186
2 T2 Clorofila_a 0.866 0.212
3 TC Clorofila_a 0.866 0.212
4 TV Clorofila_a 0.861 0.191
```

```
> print(varianza_test)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3 166.79 2.557e-14 ***
20
```

```
> print(resultado_kruskal)

Kruskal-wallis rank sum test

data: Clorofila_a by Grupo
Kruskal-Wallis chi-squared = 21.732, df = 3, p-value = 7.416e-05
```

```
[1] "--- RESULTADO DE LAS PRUEBAS POST-HOC (DUNN) ---"
# A tibble: 6 × 9
  .y. group1 group2 n1 n2 statistic p p.adj p.adj.signif
* <chr> <chr> <chr> <int> <int> <dbl> <dbl> <dbl> <chr>
1 Clorofila_a T1 T2 6 6 0 0.005 0.027 *
2 Clorofila_a T1 TC 6 6 0 0.005 0.027 *
3 Clorofila_a T1 TV 6 6 0 0.005 0.029 *
4 Clorofila_a T2 TC 6 6 0 0.004 0.026 *
5 Clorofila_a T2 TV 6 6 0 0.005 0.027 *
6 Clorofila_a TC TV 6 6 0 0.005 0.027 *
```

Anexo 12. Estadística de Clorofila b.

```
[1] "Estadística Descriptiva por Grupo:"
> print(estadistica_descriptiva)
# A tibble: 4 × 14
  Grupo variable n min max median q1 q3 iqr mad mean sd
  <fct> <fct> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl>
1 T1 Concentracion 6 0.68 0.72 0.705 0.682 0.72 0.037 0.022 0.702 0.02
2 T2 Concentracion 6 0.69 0.73 0.725 0.705 0.73 0.025 0.007 0.717 0.018
3 TC Concentracion 6 0.59 0.62 0.605 0.6 0.61 0.01 0.007 0.605 0.01
4 TV Concentracion 6 2.26 2.31 2.28 2.26 2.3 0.038 0.03 2.28 0.023
```

```
[1] "Prueba de Normalidad (Shapiro-wilk) por Grupo:"
> print(normalidad_test)
# A tibble: 4 × 4
  Grupo variable statistic p
  <fct> <chr> <dbl> <dbl>
1 T1 Concentracion 0.753 0.0211
2 T2 Concentracion 0.800 0.0587
3 TC Concentracion 0.960 0.820
4 TV Concentracion 0.836 0.121
```

```
[1] "Prueba de Homogeneidad de Varianzas (Levene):"
> print(varianza_test)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
  Df F value Pr(>F)
group 3 2.5641 0.08343 .
20
```

```
> print(kruskal_result)
# A tibble: 1 × 6
  .y. n statistic df p method
* <chr> <int> <dbl> <int> <dbl> <chr>
1 Concentracion 24 20.3 3 0.000148 Kruskal-Wallis
```

### Anexo 13. Estadística de $\beta$ -caroteno.

```
[1] "Estadísticas Descriptivas por Grupo (n, media, sd):"
> print(estadisticas_descriptivas)
# A tibble: 4 x 14
  Grupo variable      n min  max median  q1  q3  iqr  mad  mean  sd  se  ci
  <fct> <fct>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl>
1 T1 Concentraci...   6  8.78  9.15  8.94  8.82  9.09  0.265  0.245  8.96  0.161  0.066  0.169
2 T2 Concentraci...   6  5.19  6.36  5.67  5.32  6.18  0.86  0.697  5.74  0.52  0.212  0.545
3 TC Concentraci...   6 40.4  42.0  41.1  40.4  41.9  1.49  1.13  41.1  0.825  0.337  0.866
4 TV Concentraci...   3 33.4  33.5  33.5  33.5  33.5  0.025  0.03  33.5  0.025  0.015  0.063
```

```
[1] "Resultados de la Prueba de Normalidad (Shapiro-wilk)"
> print(prueba_normalidad)
# A tibble: 4 x 4
  Grupo variable      statistic      p
  <fct> <chr>          <dbl> <dbl>
1 T1 Concentraci..._mgr_gr  0.873 0.237
2 T2 Concentraci..._mgr_gr  0.855 0.171
3 TC Concentraci..._mgr_gr  0.738 0.0153
4 TV Concentraci..._mgr_gr  0.987 0.780
```

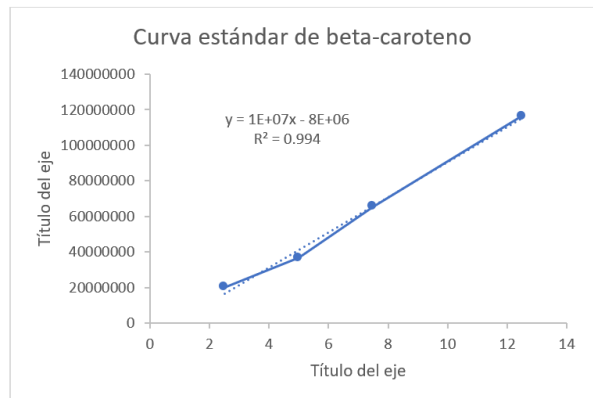
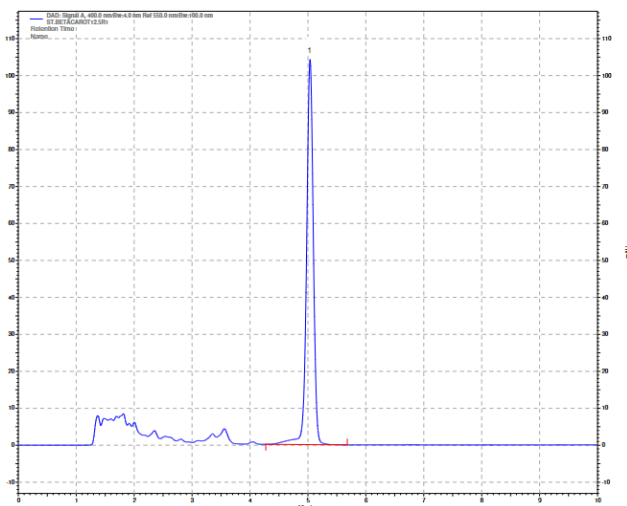
```
> # --- PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS (LEVENE) ---
> library(car)
> leveneTest(Concentration ~ GRUPOS, data = df_beta)
Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = median)
      Df F value    Pr(>F)
group 3  17.198 2.145e-05 ***
      17
```

```
[1] "Resultado de la Prueba de Kruskal-Wallis:"
> print(prueba_kruskal)

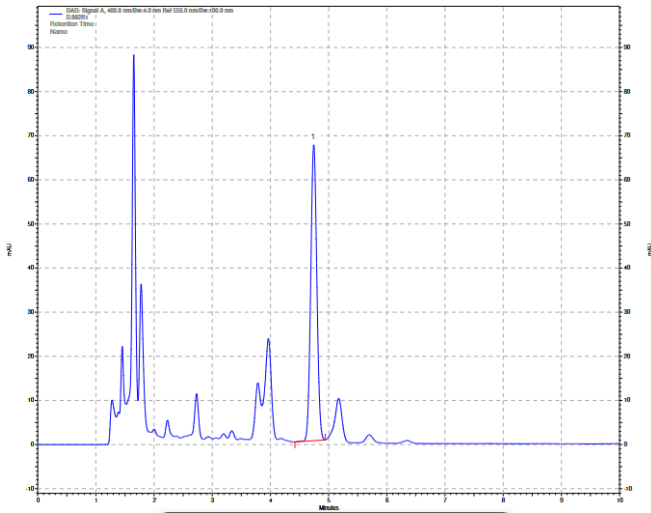
Kruskal-Wallis rank sum test

data: Concentraci..._mgr_gr by Grupo
Kruskal-Wallis chi-squared = 18.596, df = 3, p-value = 0.0003313
```

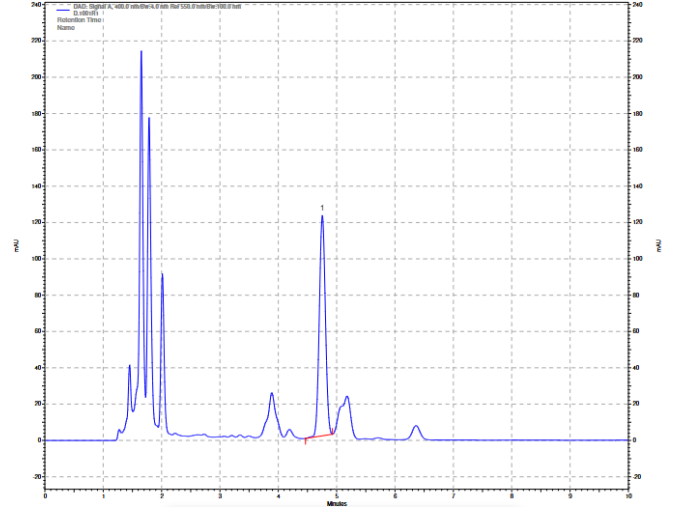
### Anexo 14. Cromatograma y curva de calibración de $\beta$ -caroteno.



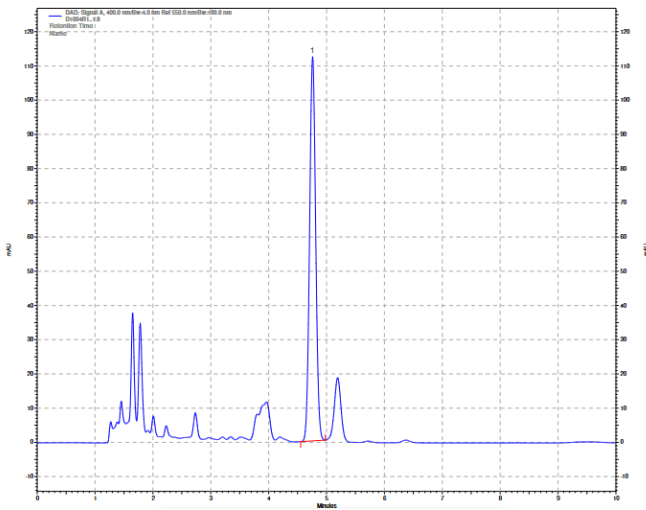
**Anexo 15.** Cromatograma  $\beta$ -caroteno T2 "800  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N"



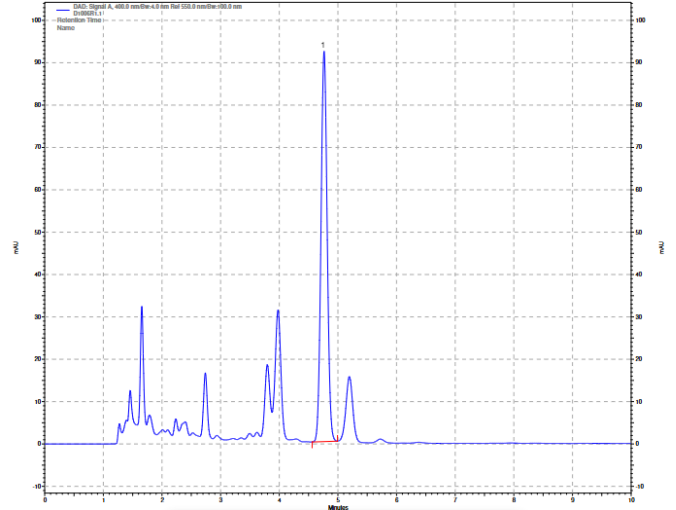
**Anexo 16.** Cromatograma  $\beta$ -caroteno T1 "500  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  y -N"



**Anexo 17.** Cromatograma  $\beta$ -caroteno Control "TC".



**Anexo 18.** Cromatograma  $\beta$ -caroteno vegetativo "TV".





# González Anghelo COMPILATIO

4%  
Textos  
sospechosos



< 1% Similitudes  
0 % similitudes entre comillas  
0 % entre las fuentes mencionadas

3% Idiomas no reconocidos

0% Textos potencialmente generados por la IA

Nombre del documento: González Anghelo COMPILATIO.docx  
ID del documento: 47a9a583ccb237cf43a78877705c58f88c0b22f1  
Tamaño del documento original: 69,84 kB

Depositante: JIMMY AGUSTÍN VILLÓN MORENO  
Fecha de depósito: 5/11/2025  
Tipo de carga: interface  
fecha de fin de análisis: 5/11/2025

Número de palabras: 12.119  
Número de caracteres: 76.640

Ubicación de las similitudes en el documento:

## Fuente

### Fuente principal detectada

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	<a href="http://www.redalyc.org">www.redalyc.org</a>   INFLUENCIA DE LA SALINIDAD Y LA IRRADIANCIA SOBRE EL CR... <a href="https://www.redalyc.org/journal/4277/427750771006/427750771006.pdf">https://www.redalyc.org/journal/4277/427750771006/427750771006.pdf</a> 3 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas: < 1% (45 palabras)