



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“EFECTO DE CONDICIONES DE ESTRÉS LUMÍNICO Y SALINO EN LA
PRODUCCIÓN DE CAROTENOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris*”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del

Título de: BIÓLOGA

AUTOR:

MARÍA CRISTINA FIGUEROA REYES

TUTOR:

BLGA. DENNIS TOMALÁ SOLANO, M. Sc.

COTUTOR:

BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN, PH.D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2026

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

“EFECTO DE CONDICIONES DE ESTRÉS LUMÍNICO Y SALINO EN LA
PRODUCCIÓN DE CAROTENOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris*”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGA

AUTOR:

MARÍA CRISTINA FIGUEROA REYES

TUTOR:

BLGA. DENNIS TOMALÁ SOLANO, M. Sc.

COTUTOR:

BLGA. JANETH GALARZA TIPÁN, PH.D.

LA LIBERTAD-ECUADOR

2026

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, "EFECTO DE CONDICIONES DE ESTRÉS LUMÍNICO Y SALINO EN LA PRODUCCIÓN DE CAROTENOS EN CULTIVOS DE *Chlorella vulgaris*", elaborado por FIGUEROA REYES MARÍA CRISTINA, 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 Bióloga, 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 apta para la evaluación del docente especialista.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Dennis Tomalá Solano', written over a horizontal line.

Blga. Dennis Tomalá Solano, MSc.

DOCENTE TUTOR

C.I. 0922584982

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**Efecto de condiciones de estrés lumínico y salino en la producción de carotenos en cultivos de *Chlorella vulgaris***”, elaborado por Figueroa Reyes María Cristina, 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. Isabel Coello Peralta, M.Sc.
DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0301902664

DEDICATORIA

A mis padres, Doris Reyes Suarez y Otto Figueroa Villón, que admiro y amo, su lucha y superación son mi guía de enseñanza. Mamá, gracias por los consejos y guía profesional, tu amor sobrepasa fronteras y me eleva a ser una persona de bien, ética y profesional. Papá, gracias por ser mi ejemplo de superación, para no conformarme y siempre buscar la superación.

A mi hermano, Christian Figueroa Reyes por ser mi apoyo, gracias por tu paciencia y comprensión. A mis tíos, Gladys Reyes, Zoila Reyes y Freile Neira, brindarme su hogar y su atención constante.

Esto es por ustedes, cada paso en mi formación académica fue impulsado por su apoyo. Este logro es tanto de ustedes como mío.

Gracias por su cariño y amor incondicional. Los quiero

AGRADECIMIENTO

Agradezco al cuerpo docente, administrativo autoridades de la Carrera de Biología de la Facultad Ciencias del Mar y de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

A mi tutora, Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc., por brindarme su tiempo y paciencia durante el desarrollo del presente trabajo, además de ser parte del cuerpo docente que me motivó a nivel profesional, su docencia impulsa e inspira profesionalmente.

A la Blga. Janeth Galarza Tipán, PhD, por permitirme el desarrollo de este trabajo de investigación en las instalaciones del proyecto, por los consejos y orientación científica.

A mis compañeras de laboratorio, Samantha Pesantez y Blga. Laura Reyes. M.Sc. por su guía y enseñanzas hasta la culminación del trabajo. Gracias por su amistad.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Figueroa Reyes María Cristina** como requisito parcial para la obtención de grado de Bióloga de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 13 de agosto de 2025



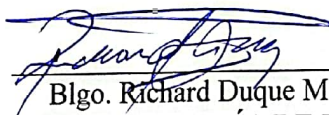
Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Blga. Isabel Coello Peralta, M.Sc.
DOCENTE DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blga. Dennis Tomalá Solano, M. Sc.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



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

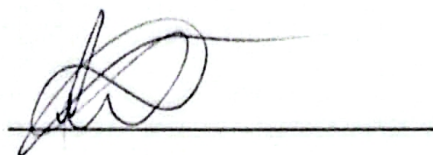


Lic. Pascual Roca Silvestre, M.Sc.
SECRETARIO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, María Cristina Figueroa Reyes, declaro bajo juramento que el contenido, ideas y análisis de resultados expuestos en este trabajo de integración curricular pertenecen de manera exclusiva y el patrimonio intelectual del mismo a la Universidad Península de Santa Elena.

Atentamente

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' and 'C' followed by a horizontal line, positioned above a solid horizontal line.

María Cristina Figueroa Reyes

C.I. 2400288722

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
4. JUSTIFICACIÓN	11
5. OBJETIVOS:	14
6. HIPÓTESIS	15
7. MARCO TEÓRICO	16
7.1. Cultivo de microalgas	18
7.2. Importancia de las microalgas	19
7.3. Microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	21
7.3.1. Morfología celular	23
7.3.2. Potencial biotecnológico del género <i>Chlorella sp.</i>	24
7.4. Requerimientos para el crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	25
7.4.1. Nutrientes	25
7.4.2. Temperatura	26
7.5. Fases de crecimiento microalgal	26
7.6. Cultivo en dos etapas	28

7.7.	Extracción de bioproductos de valor comercial	30
7.8.	Producción de biocompuestos	31
7.8.1.	Aplicaciones de los pigmentos microalgales.	32
7.9.	Pigmentos fotosintéticos	33
7.9.1.	Pigmentos en microalgas	34
7.10.	Carotenogénesis.....	36
7.11.	Condiciones de estrés	39
7.11.1.	Estresores aplicados al cultivo de microalgas.....	41
7.12.	Métodos de extracción de pigmentos microalgales	42
7.12.1.	Extracción clásica.....	43
7.12.2.	Extracción basada en energía de ondas	43
7.12.3.	Extracción con fluidos supercríticos	44
7.12.4.	Fresado con perlas	44
8.	MARCO METODOLÓGICO	46
8.1.	Tipo de investigación	46
8.2.	Lugar de estudio.....	46
8.3.	Material biológico.....	47
8.4.	Preparación del medio de cultivo	48

8.5.	Mantenimiento de la cepa <i>Chlorella vulgaris</i> en medio sólido y líquido	49
8.6.	Diseño experimental.....	51
8.7.	Cuantificación de la concentración celular.....	56
8.8.	Extracción de pigmentos	59
8.9.	Análisis estadístico	60
9.	ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	62
9.1.	Parámetros cinéticos	62
9.1.1.	Mantenimiento de la cepa.....	62
9.1.2.	Curva de crecimiento.....	63
9.1.3.	Relación de la densidad óptica y la densidad celular.....	65
9.2.	Efectos de los tratamientos experimentales bajo las condiciones de estrés....	66
9.2.1.	Análisis estadísticos.....	69
9.2.2.	Comparación entre tratamientos.....	73
9.3.	Biosíntesis de pigmentos	74
10.	DISCUSIONES	77
11.	CONCLUSIONES	82
12.	RECOMENDACIONES	84

13. BIBLIOGRAFÍA	85
-------------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Chlorella vulgaris</i>	13
Figura 2. Estructura celular de <i>Chlorella vulagris</i>.....	24
Figura 3. Fases de crecimiento microalgal.....	28
Figura 4. Esquema de factores que influyen en la obtención de biocompuestos.....	30
Figura 5. Ruta metabólica de los carotenos en microalgas	39
Figura 6. Vista satelital de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.....	47
Figura 7. Mantenimiento de la cepa <i>C. vulgaris</i>	51
Figura 8. Diseño experimental del estudio: Etapa vegetativa y de estrés.	54
Figura 9. Ilustración para cosecha de biomasa y obtención de pasta microalgal seca.	55
Figura 10. Cuantificación de la densidad por conteo celular y densidad óptica.....	57
Figura 11. Proceso de secado de biomasa húmeda para obtención de productividad.	58
Figura 12. Extracción de pigmentos con etanol al 95%.....	59
Figura 13. Vista microscópica de cultivos no axénicos y cultivos purificados.	62
Figura 14. Curva de crecimiento celular de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>.....	64
Figura 15. Curva de calibración entre la densidad óptica y densidad celular	65
Figura 16. Densidades celulares durante la etapa de estrés	67

Figura 17. Vista microscópica de células de <i>C. vulgaris</i> , durante la etapa de estrés bajo diferentes intensidades lumínicas y salinidades	68
Figura 18. Normalidad de los datos de carotenos totales.....	69
Figura 19. Interacción de factores y la media de carotenos totales.....	71
Figura 20. Efectos principales de los factores.....	72
Figura 21. Intervalos de confianza de las medias de % de carotenos totales de los diferentes tratamientos.	74
Figura 22. Contenido de pigmentos de las muestras según el tratamiento aplicado..	75
Figura 23. Grafica de área apilada de Carotenos totales y Biomasa seca total.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulación del medio NPK	48
Tabla 2. Formulación de la Solución 2 del medio NPK	49
Tabla 3. Condiciones de cultivo durante la Etapa de vegetativa.....	52
Tabla 4. Condiciones experimentales de la Etapa de estrés	53
Tabla 5. Análisis de varianzas factorial 2x2.	70
Tabla 6. Prueba de Tukey, medias y agrupaciones.	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Inoculación y escalamiento de cultivos de 1000 mL.....	114
Anexo 2. Sujetos experimentales y Diseño en Bloques.....	114
Anexo 3. Cosecha de biomasa microalgal.....	114
Anexo 4. Extracción de carotenos totales en <i>C. vulgaris</i>	115
Anexo 5. Conteo celular y densidad óptica	115
Anexo 6. Promedio de conteos celulares y densidades ópticas de tres corridas experimentales.....	115
Anexo 7. Curva de crecimiento de tres corridas experimentales.....	116
Anexo 8. Promedio de pigmentos carotenos por duplicado de los ciclos de producción	116
Anexo 9. Datos de carotenos totales, clorofila a y b.....	117
Anexo 10. Matriz para cálculo de carotenos totales, clorofila a y clorofila b.	118

ABREVIATURAS

Td: Tasa de duplicación en días

μ : Tasa de crecimiento específico

OD: Densidad óptica

DC: Densidad celular

cel/mL: Células por mililitro

DCA: Diseño Completamente Aleatorizado

Tc: Tratamiento control

T1: Tratamiento 1

T2: Tratamiento 2

T3: Tratamiento 3

mg.L⁻¹.día⁻¹: miligramo por Litro al día

μ mol foton m²s⁻¹: micromoles por metro cuadrado por segundo

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

NaCl: Cloruro de sodio

β -caroteno: Betacaroteno

α -caroteno: Alfa-caroteno

IPP: Isopentenil Pirofosfato

DMAPP: Dimetilalil Pirofosfato

MVA: Ácido Mevalónico

MEP: 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato

GPPS: Geranil Difosfato Sintasa

GGPPS: GeranilGeranil Pirofosfato Sintasa

GGPP: GeranilGeranil Pirofosfato

PSY: Fitoeno Sintasa

PDS: Fitoeno Desaturasa

ζ: Zeta

ε: Épsilon

Z-ISO: ζ-caroteno isomerasa

ZDS: ζ-caroteno desaturasa

LCYE: Licopeno ε-ciclasa

CYP97A: β-hidroxilasa

CYP97C: ε-hidroxilasa

LCYB: Licopeno β-ciclasa

CHYB: β-caroteno hidroxilasa

NaCl: Cloruro de Sodio

NaNO₃: Nitrato de sodio

CO(NH₂)₂: Urea

NH₄Cl: Cloruro de amonio

1. RESUMEN

Las microalgas constituyen una fuente sostenible de compuestos bioactivos de alto valor biotecnológico, como los carotenoides, destacándose por sus propiedades antioxidantes y su aplicación en varias industrias. El objetivo del estudio consistió en analizar la producción de carotenos en cultivos de *Chlorella vulgaris* sometidos a condiciones de estrés lumínico y salino para determinar su capacidad carotenogénica. Para este propósito, se empleó un Diseño Factorial Completamente al Azar con cuatro tratamientos y tres réplicas, evaluando dos niveles de intensidad lumínica (40 y 140 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y dos niveles de salinidad (0 y 10 ppt de NaCl). El diseño consistió en dos etapas: una fase vegetativa inicial bajo condiciones óptimas y una fase posterior de estrés. Se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento y la concentración de pigmentos mediante espectrofotometría. Los resultados mostraron que T1 con 40 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 10 ppt presentó la mayor producción de carotenos totales con 13,08 mg.g^{-1} en menor biomasa a comparación de los tratamientos Tc, T2 y T3 que fueron estadísticamente similares, indicando que un incremento simultáneo de ambos factores limita la carotenogénesis. Por lo que, la aplicación de condiciones moderadas de estrés favorece la biosíntesis de carotenoides en *Chlorella vulgaris*, mientras que niveles elevados de estrés afectan, la acumulación de biomasa celular y carotenos totales, evidenciando la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la producción de pigmentos de interés biotecnológico.

Palabras claves: *Chlorella vulgaris*, carotenos, salinidad, intensidad lumínica

ABSTRACT

Microalgae constitute a sustainable source of bioactive compounds with high biotechnological value, such as carotenoids, which are notable for their antioxidant properties and applications in various industries. The objective of this study was to analyze carotene production in *Chlorella vulgaris* cultures subjected to light and saline stress conditions to determine their carotenogenic capacity. For this purpose, a Completely Randomized Factorial Design with four treatments and three replicates was used, evaluating two light intensity levels (40 and 140 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and two salinity levels (0 and 10 ppt NaCl). The design consisted of two stages: an initial vegetative phase under optimal conditions and a subsequent stress phase. Growth kinetics and pigment concentration were determined by spectrophotometry. The results showed that T1, with 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and 10 ppt, exhibited the highest total carotene production at 13.08 mg g^{-1} , but with lower biomass compared to treatments Tc, T2, and T3, which were statistically similar. This indicates that a simultaneous increase in both factors limits carotenogenesis. Therefore, applying moderate stress conditions favors carotenoid biosynthesis in *Chlorella vulgaris*, while high stress levels negatively affect the accumulation of cell biomass and total carotenes, highlighting the importance of optimizing culture conditions to maximize the production of pigments of biotechnological interest.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, carotenes, stress, salinity, light intensity

2. INTRODUCCIÓN

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos capaces de sintetizar una variedad de metabolitos y moléculas bioactivas de interés biotecnológico, utilizadas en las industrias de biocombustibles, nutracéutica, cosmética y farmacéutica (Pulz & Gross, 2004). En la industria acuícola son aprovechadas por su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos como los antioxidantes, utilizados como complementos alimenticios (Al-Nassar & Alzurfi, 2024). Pueden proporcionar una gran cantidad de productos con valor añadido, siendo uno de los principales, los carotenoides que se producen en exceso bajo condiciones de estrés, como elevadas concentraciones de sal, alta intensidad lumínica o limitación de nutrientes (Sun et al., 2018).

Alagawany et al. (2021) indican que *Chlorella sp.* es uno de los géneros de microalgas verdes unicelulares de gran interés en varias industrias como: acuicultura, cosmetología, farmacológica, biotecnológica, sus propiedades incluyen la mejora de pigmentación, cambios en el rendimiento, efectos inmunoestimulantes, fuente de provitamina A y de contenido proteico, aplicables en las dietas de peces, camarones, etc. Además, *Chlorella sp.* puede producir altos niveles de carotenoides y clorofilas cultivadas en diversas condiciones.

La producción de microalgas se centra comúnmente en la obtención de biomasa de *Chlorella sp*, proteína de *Spirulina sp* y Betacaroteno de *Dunaliella sp* (Ben-Amotz, 1993). En ese sentido, si una microalga tiene la capacidad de coproducir proteína de alta calidad y luteína simultáneamente, se debe considerar aumentar sustancialmente la eficiencia en la producción de múltiples compuestos de alto valor implementando sistemas de producción individuales (Sui et al., 2019).

Se ha reportado que manipular las condiciones de cultivo de microalgas favorece la producción de metabolitos orgánicos de interés (Aguilar et al., 2015; Reshma et al., 2021). Por lo que, para la optimización en la producción y obtención de biocompuestos de interés, algunas especies de microalgas responden mejor a la combinación de dos factores estresantes que a un único factor de estrés (Kwak et al., 2016). Bajo condiciones de estrés los carotenoides se acumulan y protegen las células como antioxidantes para aumentar la posibilidad de supervivencia. Además, el estrés salino, la inducción lumínica y la privación de nutrientes son métodos ampliamente utilizados que pueden combinarse con otros tratamientos para impulsar la producción de carotenoides- (Ren et al., 2021).

Los carotenoides son compuestos lipofílicos de color amarillo, naranja o rojo, y constituyen los pigmentos más diversos y extendidos de la naturaleza (Sasso et al., 2012; Varela et al., 2015). Según Gong & Bassi, (2016) los carotenoides tienen

propiedades como antioxidantes, siendo capaz de: proteger a los seres humanos de una respuesta inmunitaria debilitada, envejecimiento prematuro, ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y artritis.

Entre los carotenoides conocidos en el mercado mundial predominan la astaxantina y el β -caroteno, son los dos carotenoides que representan casi la mitad del mercado de carotenoides, siendo la astaxantina es conocida principalmente por su coloración rosa, que se visualiza en peces acuáticos y camarones, exhibe una actividad antioxidante (Li et al., 2011). Por otro lado, el β -caroteno, es responsable de prevenir la acumulación de toxinas en el hígado, mejora potencialmente el sistema inmunitario y podría tener un papel preventivo en enfermedades oculares (Dufossé et al., 2005).

Existen una gran cantidad de carotenoides que forman la totalidad de este biocompuesto. Incluso ciertos carotenoides son específicos para ciertas especies de microalgas, como la fucoxantina que se encuentra en algas pardas y diatomeas, la peridininina en dinoflagelados y la aloxantina en criptofitas (Takaichi, 2011). En especies del género *Chlorella sp.* se ha logrado la caracterización de carotenos totales, que incluyen: neoxantina, violaxantina, luteína, zeaxantina y β -caroteno, la

luteína es el carotenoide más abundante y actúa como principal antioxidante en *Chlorella vulgaris* (Pinto et al., 2025).

A diferencia de los carotenoides primarios, asociados con componentes estructurales y funcionales del aparato fotosintético celular, los carotenoides secundarios se producen en grandes cantidades y se distribuyen en gotitas oleosas, formando una capa protectora cuando las células se exponen a condiciones de estrés y proporcionan el color rosa/rojo característico de algunas algas estresadas (Begum et al., 2016), por lo que la carotenogénesis es una respuesta de las células como adaptación ante las variaciones en su medio. En el presente estudio se analizó la producción de carotenos en cultivos de *Chlorella vulgaris* sometidos a condiciones de estrés lumínico y salino determinando la capacidad carotenogénica.

Además, el trabajo de investigación se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030. Contribuye en conjunto al ODS 9: industria, innovación e infraestructura y al ODS 12: producción y consumo responsables, al explorar estrategias de cultivo para la búsqueda de nuevas alternativas sostenibles para la optimización e incremento de biomasa y pigmentos de origen natural de cepas nativas, generando información y promoviendo a la innovación del

aprovechamiento de microorganismos productores de compuestos con valor agregado.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las microalgas representan un recurso biológico de interés, incluyendo a cepas nativas que han desarrollado adaptaciones fisiológicas ante las condiciones propias del lugar de origen. Sin embargo, la información disponible respecto al manejo de cultivo proviene de especies comerciales o de otras regiones, por lo que no es preciso atribuir que los requerimientos de cultivo sean equivalentes para una especie local. A pesar del potencial biotecnológico que representan para sintetizar metabolitos de alto valor agregado como los carotenoides, el uso de especies nativas locales se ve limitado por la ausencia de información ecofisiológica básica.

Es por ello, que en una cepa nativa de *Chlorella vulgaris* local se desconocen los rangos óptimos y los límites de tolerancia frente a variables de cultivo, dificultando establecer protocolos estandarizados que permitan maximizar el potencial biotecnológico y el aprovechamiento eficiente de este organismo. Existen estudios que abarcan el cultivo de especies del género *Chlorella sp* que se centran en la producción de metabolitos como lípidos y proteínas, sin considerar otros biocompuestos de interés biotecnológico como polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, vitaminas, compuestos inmunoestimulantes, antioxidantes y minerales que pueden ser aplicados en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y nutracéutica (Aguilar et al., 2015; Chankhong et al., 2018).

Por su parte, la producción de carotenoides a partir de las microalgas se ve influenciada por factores ambientales como nutrientes, fósforo, nitrógeno, alta intensidad lumínica y salinidad (Ren et al., 2021), así como los pigmentos vegetales se ven afectados por la luz, que influye en el crecimiento, la composición química y mayor eficiencia del β -caroteno (Al-Nassar & Alzurfi, 2024).

Aunque la aplicación de factores estresantes favorece la acumulación de metabolitos, la respuesta varía entre las diferentes especies de microalgas. Por una parte, el estrés nutricional junto al estrés lumínico incrementa la acumulación de lípidos en *Nannochloropsis gaditana*, mientras que en *Tetraselmis suecica* el incremento es menor (San Pedro et al., 2013). Así mismo, Fal et al. (2022) demostraron que la aplicación de diferentes niveles de salinidad con NaCl en *Chlamydomonas reinhardtii* reduce la tasa de crecimiento, pero favorece la acumulación de carbohidratos, lípidos, carotenos y polifenoles.

De manera similar, Mostafa & Hashem (2024) reportaron que el incremento de la intensidad lumínica promueve una mayor acumulación de pigmentos carotenoides en *Chlorella zofingiensis*, *Haematococcus pluvialis* y *Dunaliella salina*, además de que la composición y acumulación de carotenoides difieren entre especies. En *C. reinhardtii* la producción es menor. Esto evidencia que la respuesta

frente al estrés lumínico y salino es diferencial entre especies, y no se pueden atribuir directamente a *Chlorella vulgaris*. En consecuencia, resulta necesario optimizar las condiciones de estrés para maximizar la producción de bioproductos como los carotenoides, sin alterar drásticamente la biomasa celular.

En ese contexto, a pesar de que las investigaciones han demostrado que la aplicación de condiciones de estrés puede incrementar la acumulación de pigmentos, la respuesta depende de la especie y la cepa. En Ecuador, respecto a una cepa nativa de *Chlorella vulgaris* aislada de la provincia de Santa Elena, las condiciones de cultivo para producción de biomasa y acumulación de carotenoides han sido poco explorada a nivel nacional, limitando la disponibilidad de información que contribuya al aprovechamiento de esta especie. Por lo que, resulta necesario explorar condiciones de cultivo que, en conjunto, permitan optimizar la acumulación de pigmentos carotenoides a partir de la biomasa algal, que supone una oportunidad para destacar su potencial biotecnológico en el país, formulando la pregunta de investigación:

¿Cómo afecta la aplicación de diferentes niveles de intensidad lumínica y salina sobre la producción de carotenoides de una cepa nativa de *Chlorella vulgaris* en comparación a cultivos en condiciones óptimas?

4. JUSTIFICACIÓN

Los pigmentos de organismos representan opciones prometedoras en áreas como la farmacéutica, la alimentaria y la cosmética, principalmente por su actividad antioxidante (Ezquerro-Brauer & Chan-Higuera, 2021). Para lograr aumento en la producción de biomasa con productos de alto valor a partir del estrés se han desarrollado nuevas estrategias de cultivo, una de las más efectivas es mediante la estrategia de cultivo en dos etapas que permite separar la etapa vegetativa de la etapa de estrés durante el cultivo de microalgas (Aziz et al., 2020), permitiendo someter a uno o dos factores estresantes para la producción de metabolitos de alto valor (Chew et al., 2018).

Para la optimización en la producción y obtención de biocompuestos de interés, algunas especies de microalgas responden mejor a la combinación de dos factores estresantes que someterlas a un único factor de estrés (Kwak et al., 2016). Entre factores de estrés de interés se encuentran el estrés salino que provoca un elevado nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS), como respuesta se puede producir acumulación de compuestos antioxidantes como polifenoles, flavonoides y carotenoides para neutralizar los radicales libres (Ali et al., 2021). La luz con longitudes de onda e intensidad adecuadas también puede ser un factor de estrés que afecta o controla la producción de biocompuestos en las microalgas alterando

los tipos y niveles de metabolitos secundarios que influyen en la actividad antioxidante (Ali et al., 2021; Sajjadi et al., 2018).

Kaur et al. (2022) sostiene que la aplicación de un factor de estrés salino (NaCl) a *C. vulgaris*, especie de agua dulce, permite que se active el mecanismo de osmorregulación al producir solutos orgánicos para mantener la homeostasis osmótica, estos solutos son compatibles y poseen una mínima toxicidad.

Dentro de este contexto, Alagawany et al. (2021), Ren et al. (2021) & Wang et al. (2024) indican que especies del género *Chlorella sp.* presentan altos niveles de compuestos de interés como betacaroteno, clorofila, vitaminas antioxidantes y polifenoles. Estos compuestos están asociados con la eliminación de moléculas dañinas llamadas ROS, que se producen durante las reacciones metabólicas. Como resultado, la producción de carotenoides a partir de microalgas verdes como *Chlorella vulgaris*., ofrece un gran potencial para satisfacer la creciente demanda de fuentes naturales y sostenibles (Abubakar & Lawal, 2023).

La presente investigación es una contribución científica inédita, al caracterizar por primera vez la cepa, sentando las bases para investigaciones futuras, y reconocer el valor del patrimonio biológico de la Provincia de Santa Elena.

Otro de los aspectos que permite la investigación es la socialización y transferencia de información a la comunidad universitaria de una base sólida para futuras investigaciones biotecnológicas aplicables a la industria farmacéutica y alimentaria.

Por lo que, el presente estudio tiene como objetivo determinar la producción de carotenoides sometiendo al cultivo de *Chlorella vulgaris* a dos factores o condiciones estresantes, para comprobar la efectividad de la intensidad luminosa y adición de sales para su aplicación en el cultivo de *Chlorella vulgaris*. y aumentar o inducir carotenogénesis.

5. OBJETIVOS:

Objetivo General

Analizar la producción de carotenos en cultivos de *Chlorella vulgaris* sometidos a condiciones de estrés lumínico y salino determinado su capacidad carotenogénica.

Objetivos específicos:

- Establecer las condiciones de cultivo determinando la densidad celular y la productividad de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Determinar el tratamiento experimental óptimo aplicando condiciones de estrés lumínico y la adición de sales en los cultivos de microalga en la producción de carotenos.
- Cuantificar los carotenoides totales por espectrofotometría comparando los tratamientos experimentales.

6. HIPÓTESIS

Hipótesis alternativa: La intensidad lumínica y adición de NaCl inducen la producción de carotenoides en el cultivo de *Chlorella vulgaris*.

Hipotesis nula: La intensidad lumínica y adición de NaCl no inducen la producción de carotenoides en el cultivo de *Chlorella vulgaris*.

7. MARCO TEÓRICO

Es importante comprender el impacto del estrés abiótico en el crecimiento y la síntesis de compuestos de las microalgas. Varios elementos influyen en el crecimiento de las algas, incluida la temperatura, las concentraciones de sal, la disponibilidad de nutrientes, la fuente de carbono, el pH y la luz (Parveen et al., 2023; Josephine et al., 2022).

Las condiciones de crecimiento requeridas para mejorar la productividad de biomasa son perjudiciales para la acumulación de metabolitos deseados, y viceversa. La productividad de biomasa se mejora mediante la provisión de condiciones que aumentan la tasa de proliferación celular, mientras que la síntesis de metabolitos se mejora en condiciones de estrés (Liyanaarachchi et al., 2021).

Dentro de este contexto, el cultivo en dos etapas se ha identificado como una solución para este problema; en la primera etapa se aplican condiciones óptimas de crecimiento para obtener la máxima producción de biomasa, mientras la segunda etapa consiste en la acumulación de biocompuestos como carotenoides bajo diversas condiciones de estrés (Nagappan et al., 2019).

Investigaciones realizadas por Kaur et al. (2022) sostienen que cuando las algas se someten a un estrés salino, la actividad fotosintética se reduce significativamente; mientras que, Almutairi et al. (2021) indica que se producen retrasos en el crecimiento microalgal a concentraciones altas, al aumentar la concentración de NaCl, así mismo se produce una descomposición de la clorofila, proteínas y la acumulación de carotenoides y aceites. Según El-Sayed (2004a) & El-Sayed (2004b) la alta irradiación de luz y producción de radicales libres pueden estimular la carotenogénesis.

En estudios experimentales de Pandit et al. (2017) aplicando dosis de NaCl (0.06, 0.08, 0.1, 0.3, y 0.4 M) en dos especies de microalgas, incluyendo *Chlorella vulgaris* durante 15 días de cultivo demostró que un indicador de buena respuesta al estrés osmótico o por salinidad se evidencia al presentar una relación inversamente proporcional de Clorofila *a* y Carotenos. Se reportó que, a dosis bajas de NaCl, la Clorofila *a* presentó 32 a 25 µg/mg y los carotenoides aumentaron de 0.9 a 2 µg/mg, respectivamente. De acuerdo con, este estudio la clorofila es el principal objetivo de la toxicidad salina, lo que resulta en una reducción de la fotosíntesis y del crecimiento.

7.1.Cultivo de microalgas

Las microalgas son microorganismos unicelulares esenciales en el ecosistema, proporcionan alimento a una amplia variedad de criaturas acuáticas, y son el principal productor de la cadena alimentaria acuática, Se caracterizan filogenéticamente como Rhodophyta (algas rojas), Phaeophyta (algas pardas) y Chlorophyta (algas verdes), diferenciando por su escala macroscópica y su forma (Khan et al., 2018).

Contienen orgánulos similares a las plantas superiores, como los cloroplastos y el núcleo, pero producen biomasa de forma más eficiente, tienen un mayor rendimiento en el aprovechamiento de la luz solar, el CO₂, el agua, etc., lo que les permite tasas de crecimiento extremadamente altas (Panahi et al., 2019). Otra ventaja de las algas sobre las plantas es su capacidad para cultivarse en diversos entornos acuáticos con menor necesidad de fertilizantes y pesticidas, lo que se traduce en una disminución de residuos y contaminación (Iwamoto, 2003).

Las algas se producen en cantidad y se distribuyen directamente como alimentos y suplementos nutricionales, los extractos se utilizan en insumos biofarmacéuticos y cosméticos (Borowitzka, 2013; Luiten et al., 2003; Pulz &

Gross, 2004). Respecto a la tasa de crecimiento, es casi de 5 a 10 veces más rápida que la de los cultivos convencionales, que constituye una fuente de biomasa (Khoo et al., 2020).

Wang et al. (2024) sostienen que *Chlorella vulgaris*. presenta alto contenido de biocompuesto, considerado un producto de calidad comestible, de bajo costo, propiedades farmacéuticas, cosméticas, etc. Comercialmente, es una de las microalgas más utilizadas en la industria acuícola, por sus efectos positivos en la alimentación, la protección inmunitaria, el tratamiento del agua, la reducción del estrés y la resistencia de los peces a enfermedades (Ahmad et al., 2020).

7.2.Importancia de las microalgas

Las microalgas son abundantes en ecosistemas terrestres y acuáticos, presentan una gran diversidad, un rápido crecimiento y un metabolismo notablemente versátil, lo que les confiere una amplia gama de aplicaciones (Ren et al., 2021; Rizwan et al., 2018). Se las ha considerado prometedoras para la producción sostenible de compuestos de alto valor, por su eficiente absorción de nutrientes, capacidad para prosperar en diversas condiciones ambientales y biomasa rica en diferentes biocompuestos, constituyen un potencial depósito natural de sustancias bioquímicas como lípidos, proteínas y pigmentos (Gong & Bassi, 2016; Hernández et al., 2013).

Según Kumar & Bharadvaja (2024) indican que el mercado mundial de algas para finales del 2025 alcance los 970 millones de dólares estadounidenses y que el de carotenoides alcance los 2000 millones de dólares estadounidenses para 2026, incluyendo principalmente alimentos y bebidas (26,1%), productos farmacéuticos (9,2%), cosméticos (6,5%) y suplementos dietéticos (23,5%) (Liu et al., 2021). Algunos géneros, como la *Chlorella sp.* y la *Spirulina*, tienen estatus GRAS y son bien aceptadas como alimentos saludables (Gong & Bassi, 2016).

Guedes et al. (2011) sostienen que los diferentes biocompuestos pueden usarse como alimento para animales acuáticos y terrestres, el valor nutricional de la biomasa de las microalgas va mucho más allá e incluye el uso como colorante en acuicultura y suplemento de alto contenido proteico o de ácidos grasos poliinsaturados en dietas humanas. En consecuencia, los mercados alimentario, farmacéutico y cosmético se han beneficiado de una creciente gama de productos de microalgas.

Conforme a Wan Mahari et al. (2025) en los últimos años, las microalgas se consideran como una fuente sostenible de carotenoides, la aplicación mejora el atractivo visual de los productos y su propiedad antioxidante influye de manera

positiva en la salud, ejemplo: el uso de astaxantina como aditivo dietético mejora el crecimiento y la pigmentación del *Exopalaemon carinicauda* (camarón blanco de cola estriada)

7.3. Microalga *Chlorella vulgaris*

La microalga verde eucariota *Chlorella vulgaris*, crece en agua dulce y ha estado presente en la Tierra desde el período precámbrico, hace 2500 millones de años, y desde entonces su integridad genética se ha mantenido constante (Safi et al., 2014).

Pertenece a la siguiente clasificación taxonómica según Yağcılar (2022) y (Champenois et al., 2015):

Dominio: Eucariota

Reino: Protista

División: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

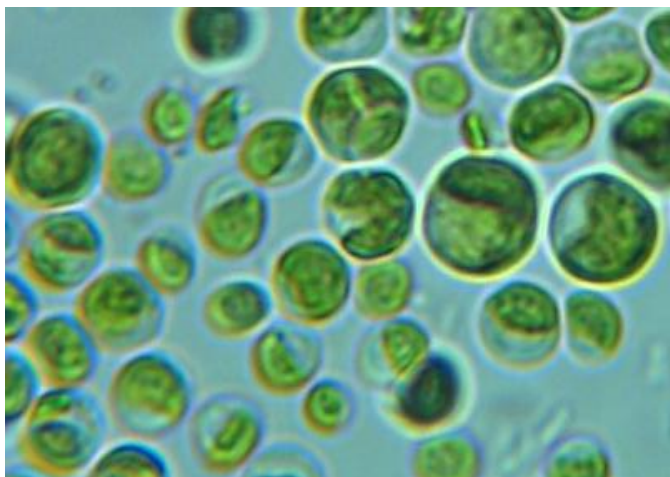
Familia: Chlorellaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *C. vulgaris*

Figura 1.

Células de Chlorella vulgaris en aumento 100 x



Se caracteriza por tener una forma esférica con diámetro de 2-10 μm y posee estructuras como las plantas superiores (Yamamoto et al., 2004a; Yamamoto et al., 2005b). Posee una pared celular rígida que preserva la integridad de la célula y protección para invasores y entornos hostiles, esta pared varía según la fase de crecimiento (Safi et al., 2014). En fase temprana la pared celular del autoesporangio es frágil. La pared celular de las células hijas aumenta gradualmente tras la maduración, y forma una capa compuesta de glucosamina, razón de la rigidez de la pared celular (Kapaun & Reisser, 1995; Němcová & Kalina, 2000).

Similar que otras microalgas, poseen compuestos bioquímicos de valor biotecnológico entre los que destacan sus componentes primarios: proteínas, carbohidratos, lípidos, pigmentos, vitaminas y antioxidantes (Pignolet et al., 2013).

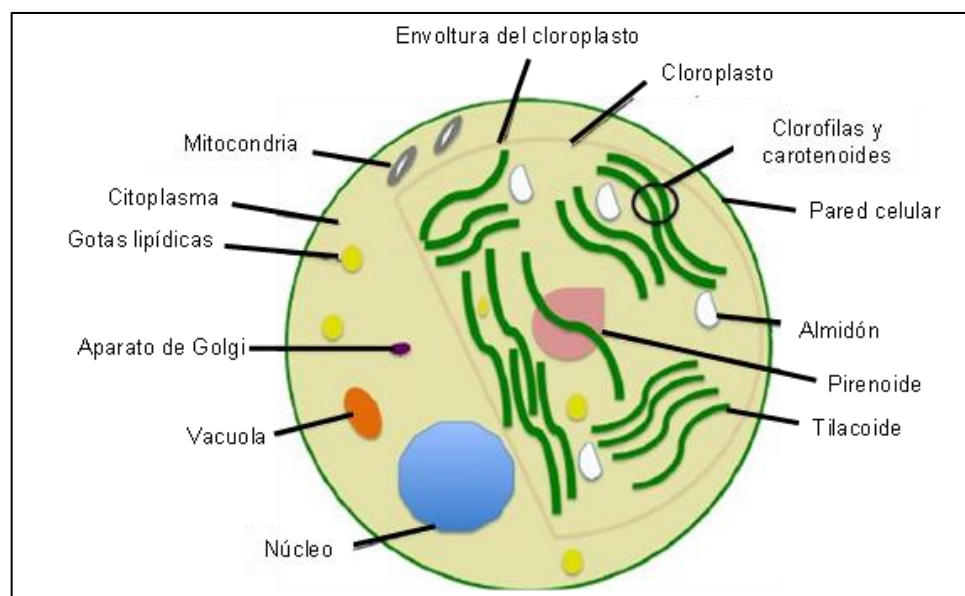
Según Azaman (2016) el perfil pigmentario de algunas especies del género *Chlorella sp.* es similar al de las plantas superiores, en los que se incluyen pigmentos como carotenoides primarios y secundarios. Los carotenoides primarios son α -caroteno, β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina y zeaxantina. Los carotenoides secundarios en este género son equinenona, hidroxiequinenona, cantaxantina y astaxantina (Gouveia et al., 1996).

7.3.1. Morfología celular

Las células mantienen una estructura esférica o elipsoidal que a menudo se subclasifica en cuatro grupos: células esféricas, elipsoidales, esféricas o elipsoidales y globulares a subesféricas; no poseen flagelos, pueden dividirse y subdividirse en cuatro células cada 16 a 20 horas mediante un fenómeno reproductivo inmóvil que da a las células el nombre de autoesporas (Hoshina & Fujiwara, 2013). Durante su fase vegetativa contiene un cloroplasto parietal o en forma de copa rodeado por una doble membrana. Poseen un pirenoide, rodeado por una vaina de almidón que actúa como almacenamiento (Figura 2).

Figura 2.

Estructura celular de Chlorella vulgaris.



Nota: Se visualizan los organelos o contenido celular de especies de *C. vulgaris* Tomado de *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review* por Safi et al., 2014.

7.3.2. Potencial biotecnológico del género *Chlorella* sp.

Dimopoulou et al. (2025) manifiestan que la *Chlorella* sp. ha sido considerada superalimento debido a su rico perfil de nutrientes que proporciona compuestos esenciales necesarios para la producción y equilibrio de las hormonas, y conocida por sus beneficios potenciales para apoyar la salud intestinal general. Se ha demostrado que, los extractos de *Chlorella* sp. tienen propiedades antitumorales y antioxidantes (Matos et al., 2017). El contenido de proteína puede oscilar dentro del 60% en *Chlorella* sp., mayor en comparación con otras microalgas, y es una fuente de proteína completa, lo que significa que contiene los nueve aminoácidos esenciales (Olasehinde et al., 2017). Otro uso es producir comidas saludables y

aditivos alimentarios. El consumo diario como suplemento puede ayudar en la reducción del porcentaje de grasa corporal, el colesterol total sérico y los niveles de glucosa en sangre (Olasehinde et al., 2017).

7.4.Requerimientos para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

7.4.1. Nutrientes

Entre los principales nutrientes para el cultivo de microalgas destacan el nitrógeno y el fosfato (macronutrientes), que estarán presentes en mayor proporción en los diferentes medios de cultivo, mientras que elementos como el zinc, el potasio, el cobalto, el boro, el magnesio y el manganeso se consideran micronutrientes, se requieren solo en pequeñas concentraciones, pero son vitales para la producción de enzimas y el crecimiento celular (Juneja et al.,2013). Las fuentes de nitrógeno incluyen NaNO_3 , $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ y NH_4Cl , y la productividad de las microalgas depende o varía según la fuente de nitrógeno, considerando que el crecimiento celular aumenta con la concentración de nitrógeno para todas las fuentes, pero a altas concentraciones se inhibe debido a la acumulación de NH_4^{4+} , y a la disminución progresiva del pH del medio (Chhandama et al., 2023).

Otro elemento importante que influye en el desarrollo de las células y la formación de biomasa lipídica es el fósforo presente en los medios de cultivo en forma de K_2HPO_4 , las concentraciones moderadas de este elemento producen

mayor biomasa seca, pero a medida que disminuye las concentraciones, el peso seco también, pero la producción de lípidos aumenta (Chhandama et al., 2023).

7.4.2. Temperatura

La temperatura afecta en la velocidad de todos los procesos metabólicos y la estructura de los componentes celulares al influir en la fluidez de la membrana, las actividades enzimáticas, así como la eficiencia de la cadena de transporte de electrones (Sun et al., 2023). La temperatura de crecimiento adecuada y la tolerancia a condiciones extremas suelen ser diferentes entre las diversas cepas de microalgas (Chhandama et al., 2023). Las altas temperaturas pueden promover la producción de pigmentos de microalgas, en un rango de 25–28 °C puede favorecer la acumulación de clorofilas, las temperaturas más altas pueden estimular el daño de las células por presión osmótica (Pathak & Singh, 2010).

7.5. Fases de crecimiento microalgal

Según Arredondo & Voltolina (2007) y Fatemeh & Mohsen (2016) el crecimiento celular de microalgas se caracteriza por seguir 5 fases de crecimiento (Figura 3):

1. Fase de adaptación: se presenta cuando existe un ligero aumento en la densidad celular de los cultivos, con fases logarítmicas cortas y de

esto puede depender el tiempo necesario para el escalamiento ascendente.

2. Fase exponencial: Durante esta fase la densidad celular aumenta en función del tiempo t según una función logarítmica:

$$C_t = C_0 \cdot e^{\mu t}.$$

Donde C_t y C_0 son las concentraciones celulares en los tiempos t y 0 , respectivamente, y μ = tasa de crecimiento específico. La tasa de crecimiento específico depende principalmente de la especie de alga, la intensidad de la luz y la temperatura.

3. Fase de desaceleración: Se caracteriza por presentar una disminución en la tasa de crecimiento, influenciada por la disponibilidad de nutrientes, la luz, pH, etc. que limitan el crecimiento y división celular, siendo más lento.
4. Fase estacionaria: La densidad celular se mantiene estable debido a que los factores limitantes y la tasa de crecimiento están en equilibrio.

5. Fase de muerte: Parte final del cultivo, la densidad celular disminuye rápidamente, aquí los nutrientes se han reducido, presencia de contaminantes, el pH, etc.

Las fases del cultivo deben considerarse debido a que definen el tiempo que las células se mantienen viables, a gran escala o laboratorio es importante cultivar o realizar escalados en la fase exponencial.

Figura 3

Fases de crecimiento microalgal



Nota: Fases de crecimiento de microalgas, en base al tiempo y densidad celular. Figura extraída de Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal de Arredondo Vega & Voltolina Lobina, 2007.

7.6.Cultivo en dos etapas

Dentro de los métodos de cultivos existen unos que logran maximizar completamente el potencial de las microalgas con el objetivo de mejorar el rendimiento de los bioproductos, consideradas estrategias de cultivo innovadoras.

Generalmente, se implementan cultivos en una sola etapa que en condiciones estresantes da como resultado una disminución en las tasas de crecimiento y por ende una pérdida en la producción y productividad, lo que se traduce en un factor limitante cuando se aplican condiciones de estrés a cultivos de microalgas, esta disminución puede impedir la producción de metabolitos primarios y secundarios deseados en condiciones normales (Adams et al., 2013; Parveen et al., 2024).

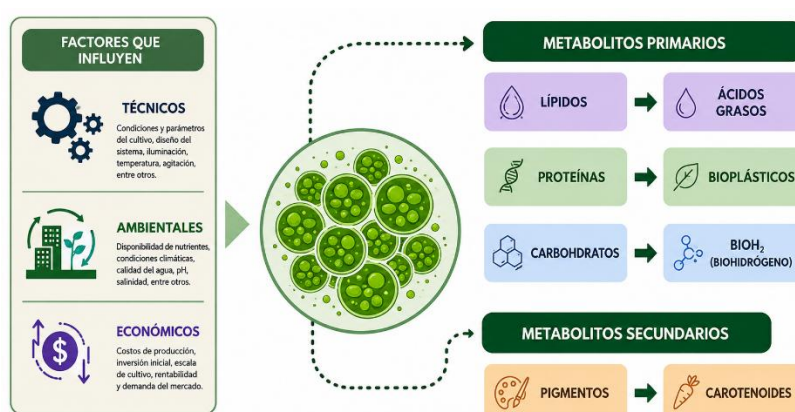
Para evitar una alta disminución en las tasas de crecimiento y mejorar la producción de compuestos de alto valor a partir de especies de *Chlorella sp.*, se aborda las estrategias de cultivo en dos etapas, que consiste en separar el crecimiento de la biomasa y la acumulación de producto, aumentando la productividad del compuesto objetivo (Nagappan et al., 2019). La primera etapa incorpora condiciones de crecimiento óptimas para una alta producción de biomasa, seguida de la exposición al estrés en la segunda etapa para la acumulación de metabolitos objetivo (Liyanaarachchi et al., 2021).

7.7.Extracción de bioproductos de valor comercial

Los bioproductos que se obtienen a partir de las microalgas tienen una amplia aplicación. Entre las microalgas de interés se encuentran las del filo Cyanophyta, Chlorophyta, Chrysophyta y Erythropphyta, destacándose por su valor comercial *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris* y *Arthrospira platensis*, se utilizan ampliamente en la producción industrial de biocompuestos (Figura 4), registrando alrededor de 200 compuestos bioactivos de cianobacterias y miles de estos de las microalgas (Wang et al., 2022). Según Kratzer & Murkovic (2021) las microalgas tienen la capacidad de acumular aceites, sustancias de reserva como la crisolaminarina y almidón, además pueden sintetizar astaxantina y β -caroteno.

Figura 4.

Esquema de factores que influyen en la obtención de biocompuestos.



Nota: Obtenido y modificado de *Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities* de Calijuri et al. (2022)

Raeisi et al. (2023) sostiene que el valor comercial de la biomasa anual de *Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Nannochloropsis spp.* (12×10^6 Kg, 24×10^6 Kg y 42×10^6 Kg, respectivamente) se logra obtener $0,5 \times 10^6$ Kg de pigmento anualmente de *H. pluvialis*, 30×10^3 Kg de omega-3 de *C. vulgaris*, 6×10^6 kg de biodiésel, 7×10^6 kg de biogás y 5×10^6 . de *Nannochloropsis spp.* Además, indican que el mercado de pigmentos puede valorarse en 3 M\$/1000 Kg.

7.8.Producción de biocompuestos

Las propiedades de las microalgas han llevado a la selección de estos microorganismos para procesos aplicados y representan de gran utilidad a la biotecnología (Guedes et al., 2011). Sus componentes biológicos, incluyendo pigmentos fotosintéticos, lípidos, proteínas y compuestos fenólicos, se utilizan en una variedad de aplicaciones, como suplementos alimenticios, fertilizantes, medicamentos y biodiesel (Parveen et al., 2024).

Las microalgas tienen la capacidad de fácil adaptación al estrés ambiental, lo que permite que la biomasa de microalgas contenga pigmentos de alto valor y compuestos fenólicos con capacidad antioxidante para ser utilizados como ingredientes para alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos (Almendinger et al., 2021).

Las microalgas tienen el potencial de servir como un depósito natural de sustancias bioquímicas con diversos beneficios para la salud. En comparación con las plantas superiores, las microalgas tienen una tasa de crecimiento más rápida. Lin et al. (2015) revisaron los aspectos tecnológicos y la productividad de la luteína utilizando microalgas frente a flores de caléndula. Las microalgas, especialmente las cepas que pertenecen a las clorofitas, como *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella zofingiensis* y *Chlorella pyrenoidosa*, se han desarrollado con éxito en la producción masiva de β -caroteno, astaxantina, cantaxantina, luteína y otros carotenoides (Mostafa & Hashem, 2025).

7.8.1. Aplicaciones de los pigmentos microalgales.

Los carotenoides ofrecen importantes beneficios para la salud, como una mejor inmunidad, menor inflamación y el apoyo a la salud ocular, incluyendo cualidades nutricionales y funcionales de los carotenoides de las microalgas los hacen populares en la alimentación animal, los cosméticos y los nutraceuticos (Prates, 2025).

La astaxantina posee efectos neuroprotectores, cardiovasculares y antienviecimiento, además de modular citoquinas inflamatorias como la IL-6 y el TNF- α (Shi et al., 2023). La luteína y la zeaxantina, abundantes en *Chlorella*

zofingiensis y *Scenedesmus spp.*, protegen la retina del estrés oxidativo y la luz azul dañina. Estas xantofilas se acumulan en la mácula y son esenciales para prevenir la degeneración macular relacionada con la edad (Spinola & Díaz-Santos, 2020).

Las clorofilas poseen cualidades antiinflamatorias, desintoxicantes y antioxidantes que proporcionan varios beneficios para la salud (Prates, 2025). Reduce la probabilidad de desarrollar enfermedades crónicas como el cáncer y las enfermedades cardíacas, favorece la desintoxicación hepática mediante la eliminación de toxinas del organismo (Chettri et al., 2026). Además, mejora los procesos metabólicos, lo que puede contribuir al control del peso, y mejora la salud intestinal, facilitando una mejor digestión, desintoxica y fortalece el sistema inmunitario por la capacidad de la clorofila para unirse a metales pesados (Dimopoulou et al., 2025b).

7.9.Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos localizados en las membranas tilacoides de los cloroplastos, son los responsables de capturar la luz y transformarla en energía química, mecanismo denominado fotosíntesis (Krayem et al., 2021). En conjunto, los carotenoides forman parte del sistema de defensa antioxidante no enzimático, desempeñando un papel fundamental en la protección del sistema fotosintético

frente al exceso de luz y oligoelementos. Los carotenoides actúan como recolectores al atrapar ROS y luego eliminarlos

7.9.1. Pigmentos en microalgas

Los pigmentos fotosintéticos clorofilas y carotenoides, junto con esteroides, prenilquinonas y prenoles, pertenecen al grupo de lípidos vegetales isoprenoides, que Goodwin y Lichtenthaler (1976) denominaron lípidos prenílicos. Los carotenoides, como tetraterpenoides, son lípidos prenílicos simples o puros, cuyo esqueleto carbonado está compuesto únicamente por unidades isoprenoides. Las clorofilas a y b son prenillípidos mixtos y poseen una cadena fitilo isoprenoides unida a un sistema de anillos de porfirina no isoprenoides. La presencia de la cadena lateral fitilo, esterificada al grupo carboxilo del anillo, confiere a las clorofilas su carácter lipídico. Debido a su relación biogenética (vía isopentenoide), las clorofilas y los carotenoides también se denominan pigmentos prenílicos. A continuación, se presentan características de pigmentos fotosintéticos.

Clorofila: Pigmento fotosintético, que permite transformar la energía lumínica en energía química, reflejando la luz verde, por la absorción de las longitudes de onda azul y roja. Son pigmentos verdosos descubiertos en organismos fotosintéticos oxigénicos, incluyendo plantas, microalgas y

cianobacterias(H. Sun et al., 2023). La clorofila-a es necesaria para la fotosíntesis oxigénica, y la clorofila-b, absorbe energía lumínica adicional, estas son las dos formas principales presentes en las microalgas (Santos Ballardo & Rossi, 2025). En promedio, las microalgas contienen entre 0,5 y 1,0 % de clorofilas por peso seco (Spolaore et al., 2006). Muchas microalgas pueden ser la fuente de clorofilas naturales utilizadas para aplicaciones comerciales, como *Chlorella sp.*, *Monoraphidium dybowskii*, *Scenedesmus dimorphus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Pavlova lutheri*, *Ankistrodesmus falcatus* y *Chlorella vulgaris* (Begum et al., 2016).

Ficobilinas: Son solubles en agua y relativamente fáciles de aislar y purificar. Generalmente se pueden dividir en ficoeritrina, ficocianina y aloficocianina según las secuencias de aminoácidos (Bermejo et al., 2003). Están compuestas por polipéptidos portadores de cromóforos, pueden ensamblarse en ficobilisomas o adherirse a la membrana tilacoide para la fotosíntesis, siendo que en microalgas que carecen de clorofila β , se sintetizan para compensar esa brecha de absorción de clorofila α , por lo que, en el proceso fotosintético, pueden capturar energía lumínica y posteriormente transferirla a las clorofilas (H. Sun et al., 2023).

Carotenoides: Las algas poseen una variedad de carotenoides, además de las clorofilas, responsables de los tonos rojo, naranja y amarillo que se observan en diferentes especies. Estas moléculas lipofílicas, como el β -caroteno, la luteína y la zeaxantina, funcionan como pigmentos suplementarios, protegen a las células contra el exceso de energía lumínica ampliando el espectro de absorción de luz (Lim et al., 2023). Los carotenoides se clasifican como carotenos no oxigenados y xantofilas, incluyéndose alfa-caroteno, beta-caroteno, luteína, zeaxantina y astaxantina (Schüler et al., 2020).

7.10. Carotenogénesis

Los carotenoides son compuestos lipofílicos, usualmente de color amarillo, naranja o rojo y los más diversos y extendidos encontrados en la naturaleza (Sasso et al., 2012; Varela et al., 2015). La mayoría de los carotenoides comparten una estructura principal C₄₀ común de unidades de isopreno (denominada terpenoide), y se dividen en dos grupos: carotenos y xantofilas. Cada uno de los carotenoides consiste en diferentes isómeros trans y cis. Las xantofilas, los derivados oxigenados de los carotenos (que son solo hidrocarburos), son compuestos relativamente hidrofílicos debido a la presencia de grupos hidroxilo y grupos ceto en los anillos finales. Como antioxidantes, los carotenoides son en general sensibles a la luz, oxígeno y calor, lo que puede conducir a dificultades en el almacenamiento y manipulación (Gong & Bassi, 2016).

A pesar de la diversidad de la familia de los carotenoides, menos de 30 desempeñan funciones importantes en la fotosíntesis (Varela et al., 2015). La mayoría se encuentran en las membranas tilacoides y están unidos a los complejos de captación de luz (Nisar et al., 2015). Los carotenoides absorben la luz y compensan el exceso de energía en el metabolismo fotosintético. Algunos carotenoides primarios, como la luteína, actúan como pigmentos accesorios que transfieren la energía absorbida a las clorofilas (Ye et al., 2008), ampliando así el espectro de absorción de luz de las algas o plantas.

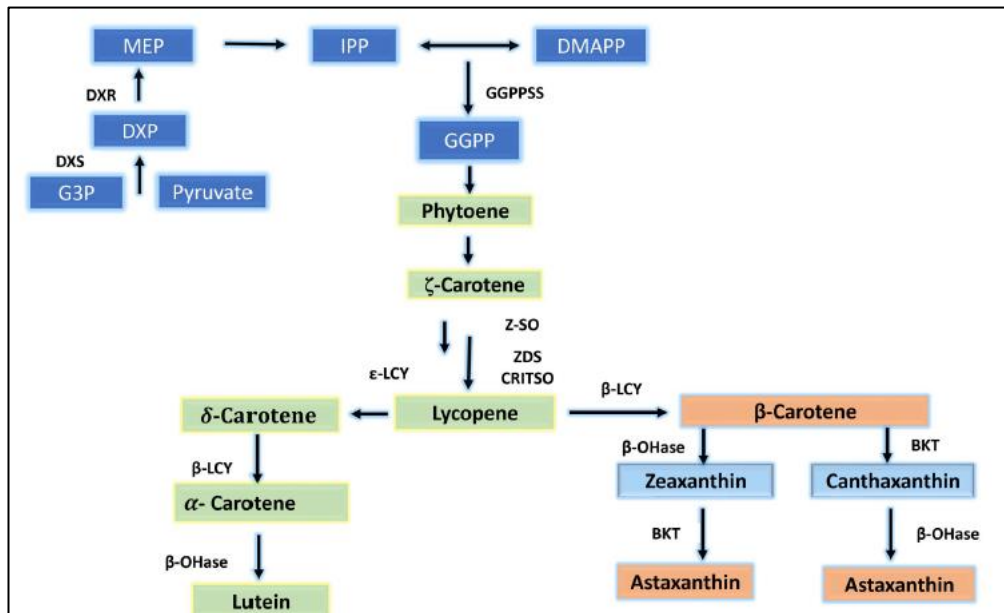
Conforme a Wan Mahari et al. (2025) y Aditi et al. (2025) se describe la ruta carotenogénica en las microalgas. Se origina a partir de la formación de isopentenil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP), que sirven como precursores fundamentales para los compuestos terpenoides. Estos se sintetizan a través de dos rutas metabólicas distintas: (i) la vía del ácido mevalónico (MVA) en el citoplasma y (ii) la vía del ácido no mevalónico, también conocida como la vía del 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), que ocurre en los plastidios (cloroplasto). En las microalgas, la vía MEP es la principal responsable de la producción de carotenoides. En el cloroplasto se producen los carotenoides primarios, vitales en la viabilidad celular. Frente al estrés, los carotenoides secundarios generan vesículas lipídicas citoplasmáticas de mayor tamaño.

La vía metabólica comienza con la síntesis de los precursores de cinco carbonos isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). Estos precursores se combinan mediante la geranil difosfato sintasa (GPPS) y la geranilgeranil pirofosfato sintasa (GGPPS) para producir el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) de 20 carbonos. Las moléculas de GGPP se condensan posteriormente mediante la fitoeno sintasa (PSY) para formar el primer carotenoide, el fitoeno. El fitoeno se desatura posteriormente por acción de la fitoeno desaturasa (PDS) y se convierte en licopeno mediante enzimas como la ζ -caroteno isomerasa (Z-ISO), la ζ -caroteno desaturasa (ZDS) y caroteno isomerasa (Cunningham & Gantt, 1998).

En este punto, el licopeno puede ingresar a las ramas α o β de la vía metabólica. En la rama α , el licopeno se cicla mediante licopeno ϵ -ciclaza (LCYE) para formar α -caroteno, que luego se convierte en luteína por acción de enzimas del citocromo P450 como la β -hidroxilasa (CYP97A) y la ϵ -hidroxilasa (CYP97C). En la rama β , el licopeno se cicla por la licopeno β -ciclaza (LCYB) para formar β -caroteno (Cordero et al., 2012). El β -caroteno puede convertirse en zeaxantina por acción de la β -caroteno hidroxilasa (CHYB) o en astaxantina mediante la cetolasa.

Figura 5.

Ruta metabólica de los carotenos en microalgas



Nota: Extraído de Aditi et al. (2025).

La producción de estos pigmentos depende del estrés impuesto por las condiciones ambientales. Se ha informado que especies del género *Chlorella* *sp.* sintetizan β-caroteno, luteína y clorofila-a inmediatamente antes de la fase estacionaria, y se observó que la concentración de estos carotenoides se redujo en contraste con el aumento de la producción de astaxantina y cantaxantina bajo alta intensidad lumínica, estrés salino y falta de nitrógeno(Gouveia et al., 1996).

7.11. Condiciones de estrés

El estrés abiótico puede estimular metabolitos tanto primarios como secundarios en las microalgas. El estrés abiótico, como las variaciones en las

concentraciones de sal, las condiciones de luz (color o intensidad), el agotamiento del nitrógeno, el pH, la temperatura, etc., provoca modificaciones abruptas en las células de las microalgas (X. M. Sun, Geng, et al., 2018).

Paralelamente, Gong & Bassi (2016) mencionan que las condiciones ambientales desfavorables pueden aprovecharse para la evolución adaptativa como estrategia de crecimiento utilizada para mejorar la producción de carotenoides. Los diferentes parámetros involucrados en el proceso pueden contribuir a obtener una alta productividad de carotenoides. Además, la producción limitada de biomasa bajo estrés podría contrarrestarse mediante la aplicación de una estrategia de crecimiento multietapa (Minhas et al., 2016).

Según Sportiello et al. (2024) las microalgas producen altas cantidades de xantofilas y carotenoides, como β -caroteno, luteína y zeaxantina, tanto en condiciones normales de crecimiento como cuando se estimula la carotenogénesis.

7.11.1. Estresores aplicados al cultivo de microalgas

La inducción al estrés en microalgas produce una sobreexcitación de la maquinaria fotosintética, reduciendo la actividad, que provoca Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que pueden dañar las estructuras celulares y las proteínas en las microalgas (Zavafer y Mancilla, 2021). En respuesta, se disminuye la clorofila para evitar absorber y minimizar el daño a sus sistemas, activando mecanismos de excitación no fotoquímica, mediada por la xantofila (carotenoide) que potencia el mecanismo de fotoprotección (Zavafer & Mancilla, 2021). Dentro de los estresores aplicados en el cultivo de microalgas, se destacan los siguientes:

Nutrientes: Se puede mejorar el potencial de las células de microalgas para sintetizar carotenoides mediante un medio de cultivo con diferentes proporciones de carbono y nitrógeno (Guarin-Villegas et al., 2020). La suplementación de sustratos de carbono, incluidos citrato, malato y piruvato, en condiciones sin iluminación acelera la síntesis de astaxantina (Bhatnagar et al., 2011). Así mismo, las condiciones de deficiencia de nitrógeno también se vincularon con una mayor producción de cantaxantina, como se informó en *Chromochloris zofingiensis* y *Coelastrella sp.* (Hu et al., 2018).

Luz: Diferentes proporciones espectrales de luz, como rojo, azul, verde, tienen un impacto en la composición relativa de pigmentos de las microalgas (Kagawa & Suetsugu, 2007). Según Coulombier et al. (2020) bajo luz blanca y alta intensidad lumínica se puede obtener un mayor contenido de β -caroteno. El aumento en la intensidad o mayor irradiación aumenta hasta dos veces la concentración de carotenoides (Indrayani et al., 2022).

Salinidad: Distintas concentraciones de sal afectan la producción de carotenoides. Mehariya et al. (2022) registraron un aumento de casi tres veces la producción de carotenoides en *Desmodesmus* después de la exposición a 40% de NaCl con iluminación moderada de luz. El estrés salino altera la permeabilidad de la membrana o dañarla, por lo tanto, es importante optimizar las concentraciones de sal y seleccionar especies halotolerantes (Sirohi et al., 2022).

7.12. Métodos de extracción de pigmentos microalgales

Existen varias metodologías de extracción cada una se caracteriza por el uso de solventes, que permiten irrumpir en las células y extraer su contenido. Se diferencian por el uso de equipos y protocolos diferentes. Entre los métodos más utilizados Chettri et al. (2026) y Pagels et al. (2021) destacan las siguientes:

7.12.1. Extracción clásica

Es un método tradicional y se basa en el uso de solventes de extracción y puede estar asociada o no a un tratamiento térmico de calor o frío. Implica la obtención de un extracto que se obtiene a través de la mezcla de dos fases: solvente y biomasa que se unifican hasta alcanzar un equilibrio y se obtenga la solución solvente-biomasa. El proceso permite que el solvente actúe como un disruptor de compuestos intracelulares, penetrando la pared celular, perforando o disolviendo la membrana. Además, el uso del solvente depende mucho de la afinidad química con los pigmentos objetivos y la naturaleza de la membrana o pared celular. En el caso de solventes no polares se utilizan para extracción de carotenoides por su alta hidrofobicidad. La efectividad de la extracción puede aumentar si se combinan con agitación, se mezclan varios solventes, y se definen varias etapas de extracción.

7.12.2. Extracción basada en energía de ondas

Se reconocen dos métodos, la Extracción Asistida por Microondas (MAE) y la Extracción Asistida por Ultrasonido (UAE), si bien son una alternativa a otros métodos, no se ha optimizado protocolos, permite una mejor ruptura celular. Por un lado, UAE se basa en un mecanismo de cavitación acústica, mediante cambios rápidos de presión y el adelgazamiento de la membrana conducen a la ruptura celular, permitiendo la penetración del solvente. Y en la MAE se aplica radiación de microondas que induce un choque térmico y degradación de la pared celular, lo que conduce a una ruptura celular.

7.12.3. Extracción con fluidos supercríticos

Se basa en el uso de un solvente supercrítico, que tiene la capacidad de permear la célula, como un gas y actuar como solvente líquido al solubilizar compuestos. Se utilizan solventes de baja polaridad, no inflamables y no tóxicos. Consta de una bomba de alta presión, cámara de calentamiento, de extracción y recolección. El método permite la permeación del solvente en la biomasa, expandiendo la célula y solubilizando compuestos objetivos.

7.12.4. Fresado con perlas

O también denominado molienda con perlas, es una técnica que emplea perlas de alta velocidad que pueden ser compuestas de acero, vidrio o cerámica, se utilizan para romper las células mediante colisiones y fuerzas de cizallamiento. Su eficiencia se basa en el daño mínimo a moléculas intracelulares y logra una alta eficiencia de ruptura celular. Requiere de la combinación de otros métodos o técnicas, no es selectiva, para la extracción de pigmento, es necesario el uso de solventes.

Dentro de las metodologías utilizadas, la convergencia de dos o más técnicas o métodos aumentan la efectividad de la extracción. En especies de *Chlorella sp.* la

molienda con perlas es una técnica que aumenta la efectividad de extracción y puede ser reproducible (Chettri et al., 2026) .

De acuerdo con Sarkar et al. (2020) para la efectividad de la extracción de pigmentos microalgales, dependerá de la selección del tipo de solvente convencional (etanol, metanol, acetona, etc), el pretratamiento (molienda con perlas y la centrifugación) y si la muestra es húmeda o seca, mejoraran el rendimiento del proceso de extracción.

El estado de la biomasa de extracción (húmeda o seca) influye mucho en la obtención final de extractos pigmentarios. Por un lado, los procesos de secado causan daños morfológicos y desplazan los compuestos que la constituyen. Siendo que la extracción con biomasa seca reduce el rendimiento de extracción, optar por el uso de biomasa húmeda es adecuada para la cuantificación de carotenos (Schüler et al., 2020). Según Kulkarni & Nikolov (2018) el etanol es eficaz en la extracción de carotenoides y clorofilas de biomasa húmeda de *C. vulgaris*, aplicando varias etapas de extracción.

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1. Tipo de investigación

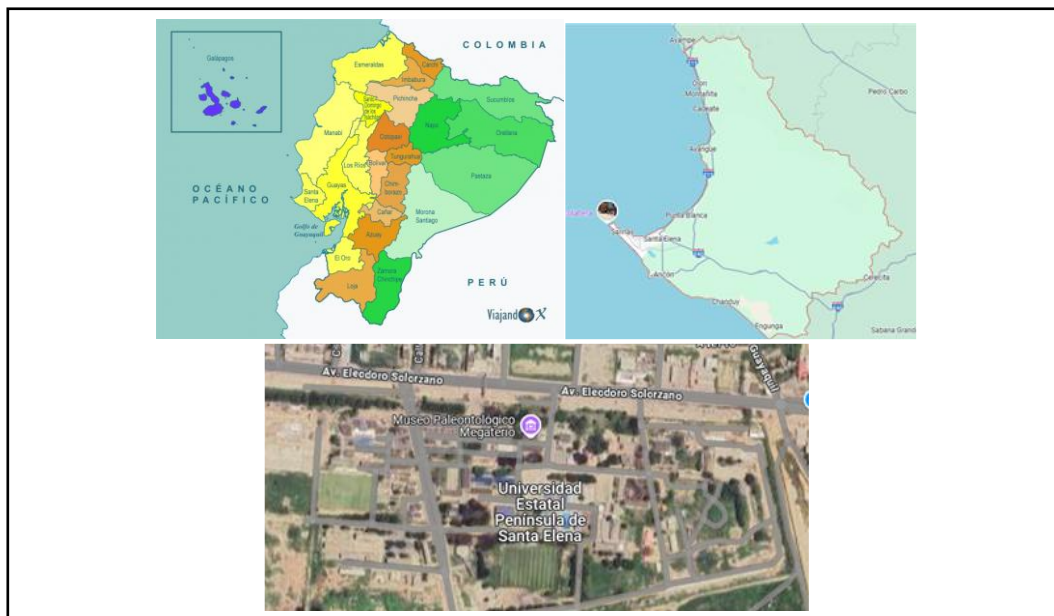
La presente investigación de tipo experimental, aplicada y cuantitativa consistió en evaluar el cultivo de *Chlorella vulgaris* sometida a condiciones estresantes de intensidad lumínica y salinidad determinando la producción de pigmentos fotosintéticos, incluyendo los carotenos totales.

8.2. Lugar de estudio

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio 5 de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (Figura 6), bajo el proyecto: “Registro de una colección de cepas microalgales con valor biotecnológico para investigación y desarrollo de bioproductos” registrado con el código CUP: 91870000.0000.389574 con el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

Figura 6.

Vista satelital de la Universidad Estatal Península de Santa Elena



Nota: Tomado de Google Earth

8.3.Material biológico

La cepa de microalga *Chlorella vulgaris* identificada molecularmente, fue codificada en el laboratorio de microalgas de la UPSE como PM-UPSE-O22 y registrada en el banco de genes con el código PX440406.1 del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se obtuvo de la colección de cepas aisladas del proyecto, que cuenta con el permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (MAATE): MAATE-DBI-CM-2022-0264.

8.4.Preparación del medio de cultivo

Los cultivos de *Chlorella vulgaris*. fueron cultivadas en medio NPK (Nitrógeno, Fósforo, Potasio) un fertilizante Inorgánico conocido comercialmente como Nitrofoska Foliar 30-10-10 con las siguientes composiciones y concentraciones que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.

Formulación del medio NPK

Formulación del “Nitrofoska Foliar 30-10-10”	
Solución 1	1 g/L
Compuesto	Contenido % p/p
Nitrógeno total (N)	30.00
Fósforo (P₂O₅)	10.00
Potasio (K₂O)	10.00
Magnesio (MgO)	0.30
Boro (B)	0.016
Zinc (Zn)	0.015
Hierro (Fe)	0.068
Manganeso (Mn)	0.05
Cobre (Cu)	0.017
Molibdeno (Mo)	0.015
Azufre (S)	5.11
Solución 2	
Vitaminas	1 µL/mL

Para la preparación del medio de cultivo NPK se disolvió 1 g del fertilizante en 1000 mL de agua destilada (dH₂O), según lo establecido por Silva & Fonseca (2018). Posteriormente, se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121°C a 15 PSI durante 20 min. La solución de vitaminas se preparó en un stock concentrado y adicionado al medio a una relación de 1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ conforme a la Tabla 2.

Tabla 2.

Formulación de la Solución 2 del medio NPK

Stock de vitaminas	1 $\mu\text{L.mL}^{-1}$
Tiamina B1	0.1 g
Cyanocobalamina B12	0.5 g
Biotina H	1 g
Agua destilada	100 mL

8.5. Mantenimiento de la cepa *Chlorella vulgaris* en medio sólido y líquido

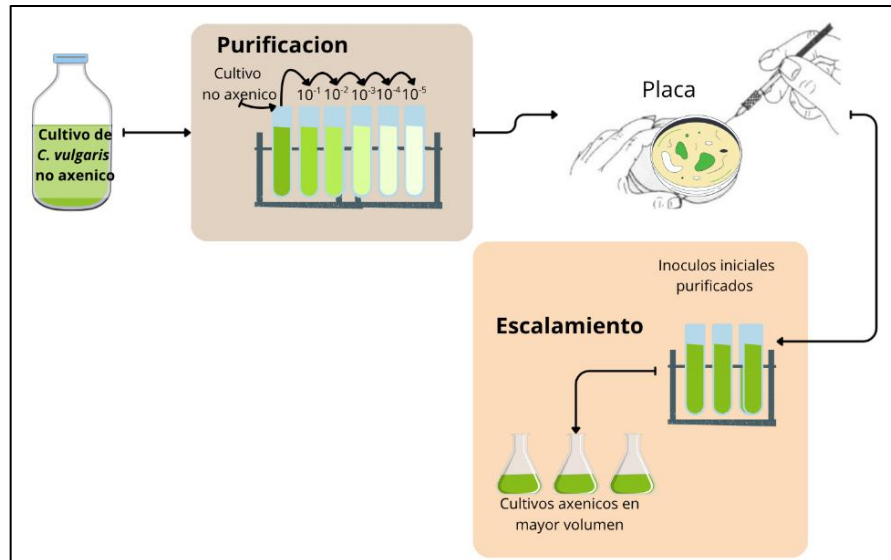
Para obtener cultivos purificados y axénicos, se aplicó la técnica de diluciones seriadas que de acuerdo al método de Fernandez-Valenzuela et al. (2021), consistió en preparar tubos de ensayo con 9 mL de medio de cultivo estéril. Luego, se toma 1 mL del cultivo a purificar y se transfiere al tubo inicial, se homogeniza y se obtiene una dilución 1:10. Se realizó el mismo proceso 4 veces, tomando 1 mL de forma sucesiva.

Al obtener un cultivo puro y concentrado, se procedió a preparar medios sólidos para mantener la estabilidad de la cepa. Para ello, se empleó la metodología de Stanier et al. (1971) que consistió en preparar cajas Petri con medio sólido NPK empleando Agar-agar a una relación de 1.5 g en 100 mL de dH₂O. Posteriormente, se sembró la cepa microalgal tomando una alícuota de 50 µL de un cultivo puro y concentrado, realizando rayado por agotamiento.

Para el escalamiento de los cultivos, se extrajo una colonia con el asa de platino y se vertió en tubos de ensayo con medio de cultivo estéril a un volumen de 10 mL, siendo el cultivo inicial. Los escalamientos se realizaron inoculando al 10% del volumen total de los cultivos, para un volumen de 1000 mL de medio NPK se inocularon 100 mL de cepa de un cultivo madre. La Figura 7 muestra el proceso de mantenimiento empleado.

Figura 7.

Mantenimiento de la cepa C. vulgaris



Al obtener los cultivos estos se mantuvieron a condiciones de luz fluorescente a $40 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperatura inicial de 21°C y pH 7.1 a 7.2 durante la fase vegetativa.

8.6.Diseño experimental

Para la evaluación de los factores estresantes, se utilizó un Diseño Factorial Completamente al Azar (DCA), conformado por cuatro tratamientos con tres replicas biológicas cada uno, para un total de 12 unidades experimentales. Se estableció un volumen total de 1000 mL en medio NPK (1%), tomados en su fase exponencial. Estas condiciones estresantes se mantuvieron durante un periodo de 15 días.

Para la determinación de la producción de carotenoides de *C. vulgaris* se utilizó la metodología empleada por Ali et al. (2021) y El-fayoumy et al. (2024) que consistió en dividir el periodo de experimentación en dos etapas de cultivo como se describe a continuación:

- 1) **Etapla vegetativa:** permitió mantener en condiciones óptimas el cultivo de microalgas. En esta fase se evaluó la cinética de crecimiento y fueron cultivadas alrededor de 10 días, sin adición de sales, con fotoperiodo de 12h:12h (Luz y oscuridad) e intensidad de 40 $\mu\text{mol fotones m}^2.\text{s}^{-1}$. Se inoculó la cepa *C. vulgaris* al 10% del medio de cultivo total, como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Condiciones de cultivo durante la Etapa de vegetativa.

Etapa vegetativa							
Condiciones de cultivo							
Intensidad lumínica ($\mu\text{mol fotones m}^2.\text{s}^{-1}$)	Sales	Medio de cultivo	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Aireación	pH	Tiempo (días)	Volumen (mL)
40	0	NPK	21-25	Manual y constante	7 - 7.2	10	10, 100 y 1000

- 2) **Etapla de estrés:** consistió en exponer a factores de estrés combinados de intensidad lumínica a 140 $\mu\text{mol fotones m}^2.\text{s}^{-1}$ de forma constante durante 24h y adicionar sales (NaCl) durante 15 días. La adición de sales se realizó de forma

consecutiva hasta que el cultivo se encontrara a una salinidad de 10 ppt o se adicionaran los 10 g.L⁻¹. Para ello, se preparó una solución stock de NaCl.

Los cultivos se dispusieron bajo un DCA factorial 2x2 completamente al azar, modelado a partir de la combinación de los factores de salinidad e intensidad lumínica. Este diseño generó cuatro tratamientos: Tratamiento control (TC), Tratamiento 1 (T1); Tratamiento 2 (T2) y Tratamiento 3 (T3), dispuestos en dos bloques, evaluados por triplicado a través de tres ciclos de producción, con las condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 4. Cada uno se obtuvo a partir de la fase vegetativa, como se ilustra en la Figura 8.

Tabla 4.
Condiciones experimentales de la Etapa de estrés

Factor	Elemento	Bloque A		Bloque B	
		Tc *	T1*	T2 *	T3 *
1	Intensidad				
	lumínica ($\mu\text{mol fotones m}^2\text{s}^{-1}$)	40	40	140	140
2	Sales (ppt)	0	10	0	10

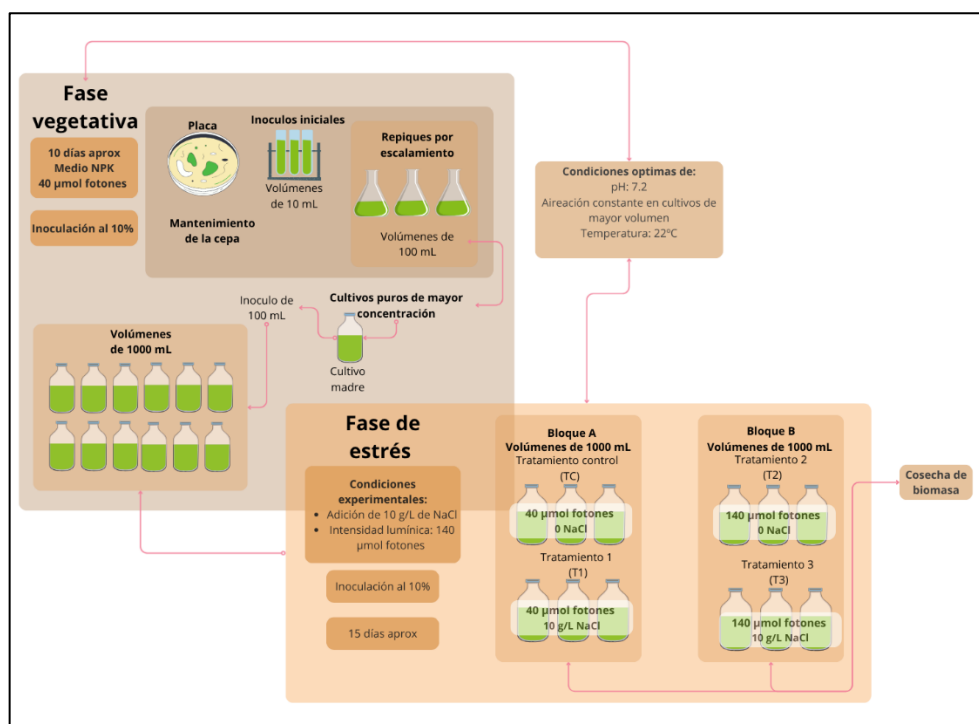
Nota: Condiciones de los tratamientos experimentales representados como: Tratamiento control (Tc), Tratamiento 1(T1), Tratamiento 2 (T2) y Tratamiento 3(T3). “*” Representa 3 réplicas por cada tratamiento.

En todos los tratamientos, se mantuvieron las mismas condiciones de temperatura, pH, aireación y cultivadas en medio NPK. Además, aireación manual a cultivos de volumen menor a 1000 mL y aireación constante a volúmenes de 1000 mL.

Los cultivos fueron ubicados en una cámara para concentrar y focalizar la intensidad de luz en los sujetos de prueba. Se tomaron datos de temperatura y pH cada 4 días. En los casos de pérdida de volumen por evaporación, se refertilizó, añadiendo agua con las concentraciones de salinidad correspondientes.

Figura 8.

Diseño experimental del estudio: Etapa vegetativa y de estrés.

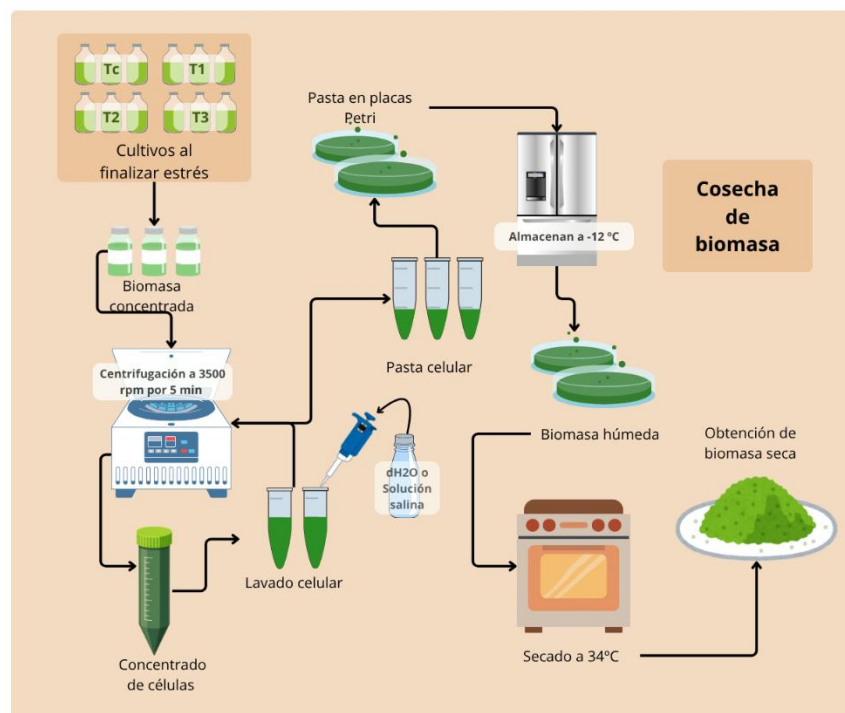


Nota: La etapa de estrés consistirá en dividir en bloques los tratamientos experimentales

Al finalizar el periodo de experimentación se cosecha la biomasa de cada cultivo con una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos. Para esto, se remueve los residuos con agua destilada y solución salina, luego se almacenan en cajas Petri en congelación para su conservación. Posteriormente, la biomasa húmeda fue deshidratada en la estufa a 34 °C por 24h, la biomasa seca fue macerada hasta obtener un polvo (Lichtenthaler, 1987; Parveen et al., 2024). En la Figura 9 se ilustra la metodología.

Figura 9.

Ilustración para cosecha de biomasa y obtención de pasta microalgal seca.



8.7.Cuantificación de la concentración celular

Durante la etapa vegetativa se realizaron conteos celulares diarios y de densidad óptica a 680 nm, según lo establecido en Ma & Jian (2023) y Ramírez-Flores et al. (2023), durante 15 días para evidenciar efectos en la viabilidad del cultivo. Se tomaron 4 ml de cada unidad experimental a la misma hora (etapa vegetativa) y se realizó el conteo celular (cel.ml^{-1}) con una cámara de Neubauer y densidad óptica en un espectrofotómetro UV-VIS, como se muestra en la Figura 10. Se tomaron datos por triplicado, en cada ciclo experimental.

Para la estimación de los parámetros cinéticos se utilizó las fórmulas propuestas por Arredondo Vega & Voltolina Lobina (2007). La cuantificación de la concentración celular se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$N = \left(\frac{\sum \text{Cel}}{5} \right) * 250000$$

Donde:

$\sum \text{Cel}$: Número de células

Para evaluar la cinética de crecimiento se consideró la tasa o velocidad de crecimiento (μ) según la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\ln(x_2) - \ln(x_1)}{(T_2 - T_1)}$$

Donde:

μ : velocidad de crecimiento

x : concentración celular(cel/ml) determinada en los tiempos

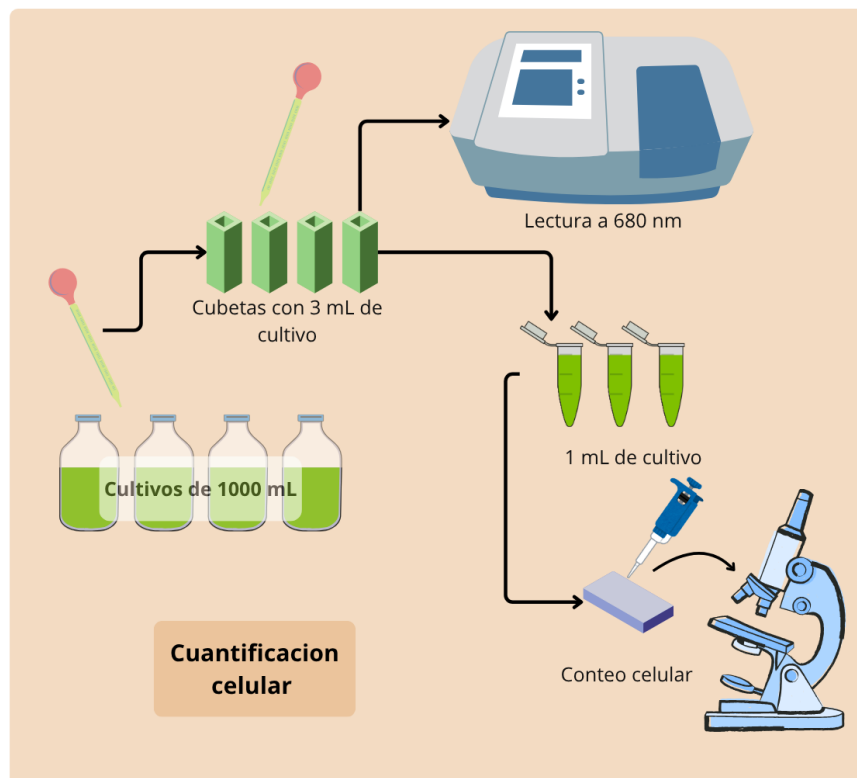
$\ln X_1$: Logaritmo natural de células al finalizar

$\ln X_1$: Logaritmo natural de células al iniciar

T : tiempo en días

Figura 10.

Cuantificación de la densidad por conteo celular y densidad óptica

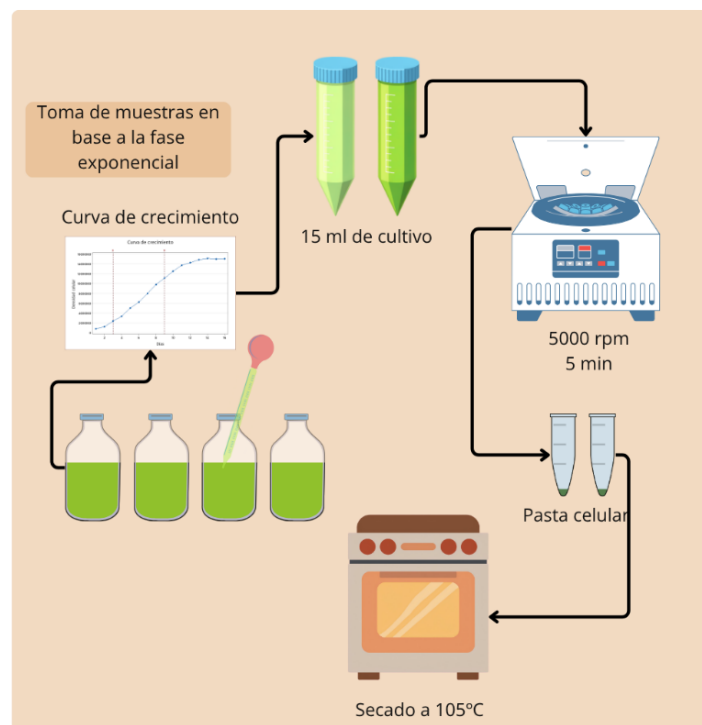


Para el cálculo de la productividad de la biomasa seca y determinar el aumento en peso seco, se tomaron dos muestras de 15 mL de cultivo en el inicio de la fase exponencial y al final de la fase exponencial según lo descrito por Arora et al. (2016) que consistió en centrifugar a 5000 rpm durante 5 min el pellet o pasta celular, posteriormente secado a 105°C por 24h (Figura 11), para el cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$P = \frac{\text{Biomasa seca final} - \text{Biomasa seca inicial}}{\text{Tiempo de cultivo}}$$

Figura 11.

Proceso de secado de biomasa húmeda para obtención de productividad.

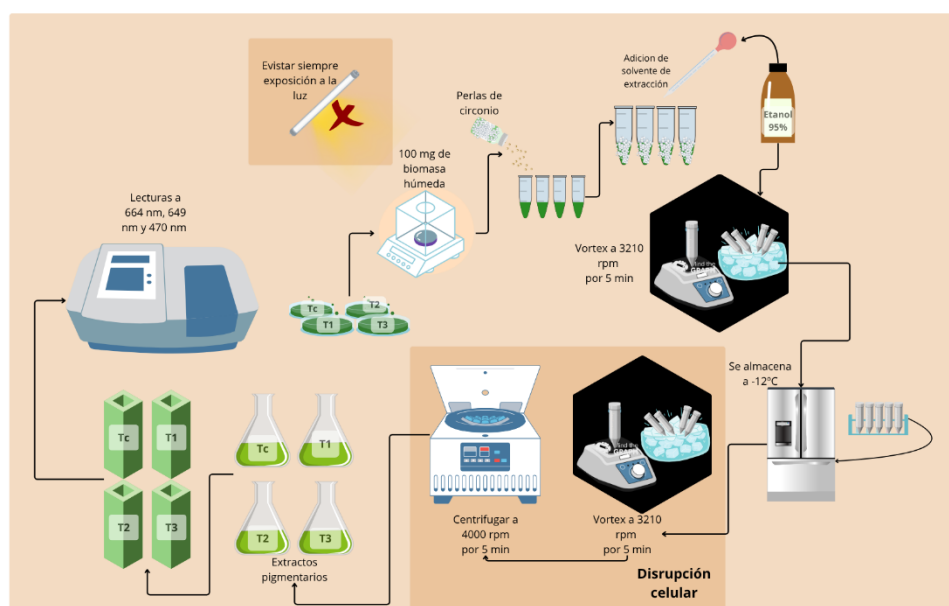


8.8.Extracción de pigmentos

Para la extracción de pigmentos (Clorofila y carotenoides) se elaboró un protocolo modificado (Figura 12) en base a las metodologías de Farobie et al. (2023), Kulkarni & Nikolov (2018) y Schüller et al. (2020) que consistió en verter 100 mg de biomasa húmeda a un tubo y adicionar etanol al 95% a una relación de 1:5 (p/v). Para lograr una mejor disrupción celular se agregaron perlas de circonio a una relación del 50% (v/v)(Aderemi et al., 2015; Qazi et al., 2021), se aplicó vortex durante 5 min a 3210 rpm. Se almacenó en congelación por 24h. Posteriormente, se repitió el proceso de disrupción celular (Vortex), incluyendo centrifugación a 4000 rpm por 5 min para separar el extracto pigmentario. Se repite el proceso de disrupción celular y la separación del extracto hasta obtener una pasta o el solvente de extracción sean incoloros. En todo el proceso de extracción se evitó que las muestras se expongan a alguna fuente de luz, y se mantuvieron frías.

Figura 12.

Extracción de pigmentos con etanol al 95%.



Al finalizar la extracción, se registran las densidades ópticas de los extractos pigmentarios, en rangos de 664 nm, 649 nm y 470 nm mediante un espectrofotómetro UV-VIS. Los datos se reemplazan en la siguiente fórmula establecida por Lichtenthaler & Wellburn (1983) para cuantificar los pigmentos extraídos:

$$\text{Clorofila } a(Cl\ a) \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 13.36(A_{664}) - 5.19(A_{649})$$

$$\text{Clorofila } b(Cl\ b) \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = 27.43(A_{649}) - 8.2(A_{664})$$

$$\text{Carotenoides totales} \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \frac{1000(A_{470}) - 2.13(Cl\ a) - 97.64(Cl\ b)}{209}$$

Al obtener los datos de la cuantificación de carotenos totales en $\mu\text{g.mL}^{-1}$, se requirió convertir a mg.g^{-1} , que según Lichtenthaler & Wellburn (1983) y Carvalho et al. (2012) sostienen que los datos obtenidos de la extracción de pigmentos se atribuyen a mg de pigmentos por cada gramo de biomasa seca (mg.g^{-1}).

8.9. Análisis estadístico

El análisis de datos se realizó aplicando la prueba de normalidad Shapiro-Willk y la prueba Levene para la homogeneidad de varianzas.

Para comparar las medias entre los grupos experimentales y determinar estadísticamente las diferencias significativas, se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA factorial) de dos vías (Pardo, 2000) con un 95% de confianza (límite de probabilidad de $p < 0,05$).

Posteriormente, se aplicó la prueba de comparación de Tukey para identificar las diferencias entre cada nivel de tratamiento (Minitab, 2025; Wong, 2010). Para la tabulación de los datos se utilizó Microsoft Excel y para el análisis de la información generada se empleó el programa Minitab Statistical Software 22.

9. ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

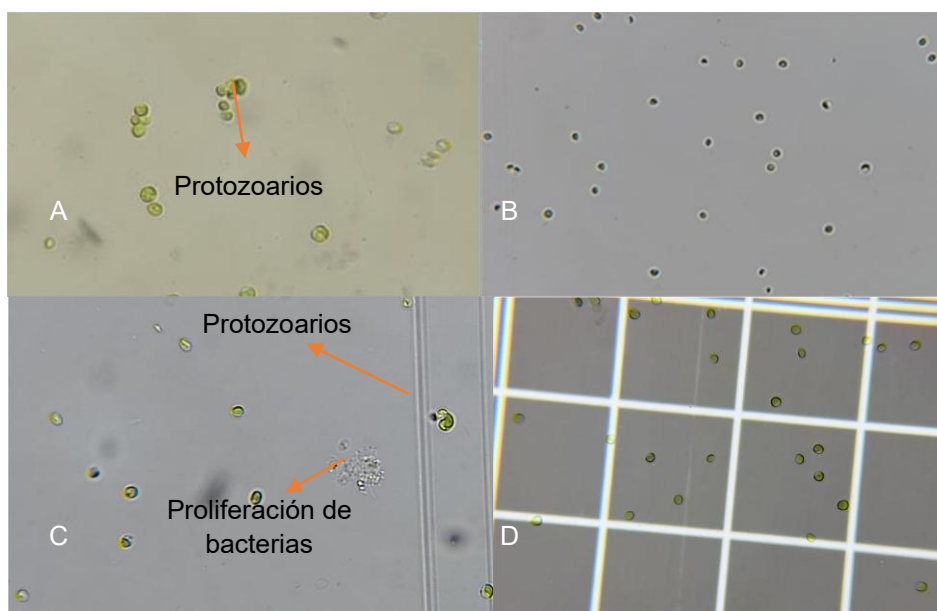
9.1. Parámetros cinéticos

9.1.1. Mantenimiento de la cepa

Para el establecimiento del cultivo vegetativo y posterior exposición al estrés, se requirió mantener cultivos axénicos y puros de *C. vulgaris*. A partir, de diluciones seriadas hasta la 10^{-5} . Se evidenció un crecimiento uniforme y ausencia de contaminación, como se muestra en la Figura 13. Se inició el escalamiento hasta obtener 12 cultivos de 100 mL, empleados como unidades experimentales.

Figura 13.

Vista microscópica de cultivos no axénicos y cultivos purificados.



Nota: Se observan células de la cepa nativa *Chlorella vulgaris* : a) y c) células con presencia de protozoarios y proliferación de bacterias; b) y d) células aisladas y purificadas: dilución 10^{-5} .

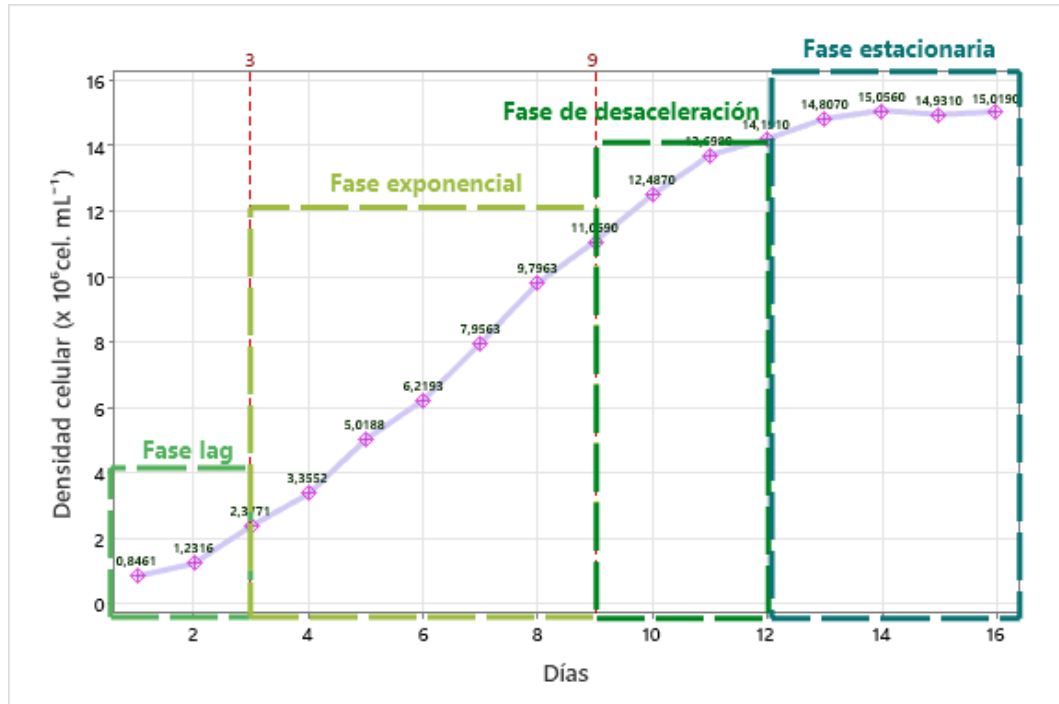
El proceso de dilución permitió asegurar la inocuidad biológica del sistema, garantizando que las respuestas se obtengan exclusivamente de los factores experimentales no de variables externas. Las condiciones óptimas que se obtuvieron para el cultivo de *C. vulgaris* fueron: pH 7.2 ± 0.05 y temperatura de 21 ± 0.34 °C, 0 ppt de salinidad y $40 \mu\text{mol fotones m}^2\text{s}^{-1}$. Se evidenció un crecimiento estable durante la etapa vegetativa, respaldada por los parámetros cinéticos y ambientales registrados.

9.1.2. Curva de crecimiento

En cultivos de 1000 mL en etapa vegetativa se obtuvo la curva de crecimiento celular de *C. vulgaris* las fases de crecimiento y el comportamiento respecto al tiempo, como se observa en la Figura 14. La fase de adaptación o lag, se evidenció durante los primeros días (0-3 días) con un inóculo inicial de 0.85×10^6 cel. mL⁻¹, caracterizado por presentar un crecimiento lento, continuado por la fase exponencial que se mantuvo por 6 días, iniciando el día 3 hasta el día 9 con 12.5×10^6 cel. mL⁻¹, existiendo un incremento en la velocidad de crecimiento. Siguiendo la tendencia de la curva, se generó la fase de desaceleración (9-11 días), denotando que la velocidad de crecimiento fue afectada por la limitación de nutrientes dando paso a la fase estacionaria.

Figura 14.

Curva de crecimiento celular de la microalga Chlorella vulgaris



Durante la etapa vegetativa se obtuvo una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.219 d^{-1} y un tiempo de duplicación (t_d) de 3.16 días, En conjunto, se calculó la capacidad de la cepa para generar biomasa, siendo una productividad (P) de $0.454 \text{ mgL}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Estos parámetros cinéticos se obtuvieron a partir de la fase exponencial, lo que refleja la capacidad del cultivo en incrementar su biomasa ante las condiciones establecidas. El comportamiento cinético observado, establece el punto de referencia adecuado para la aplicación posterior de los tratamientos.

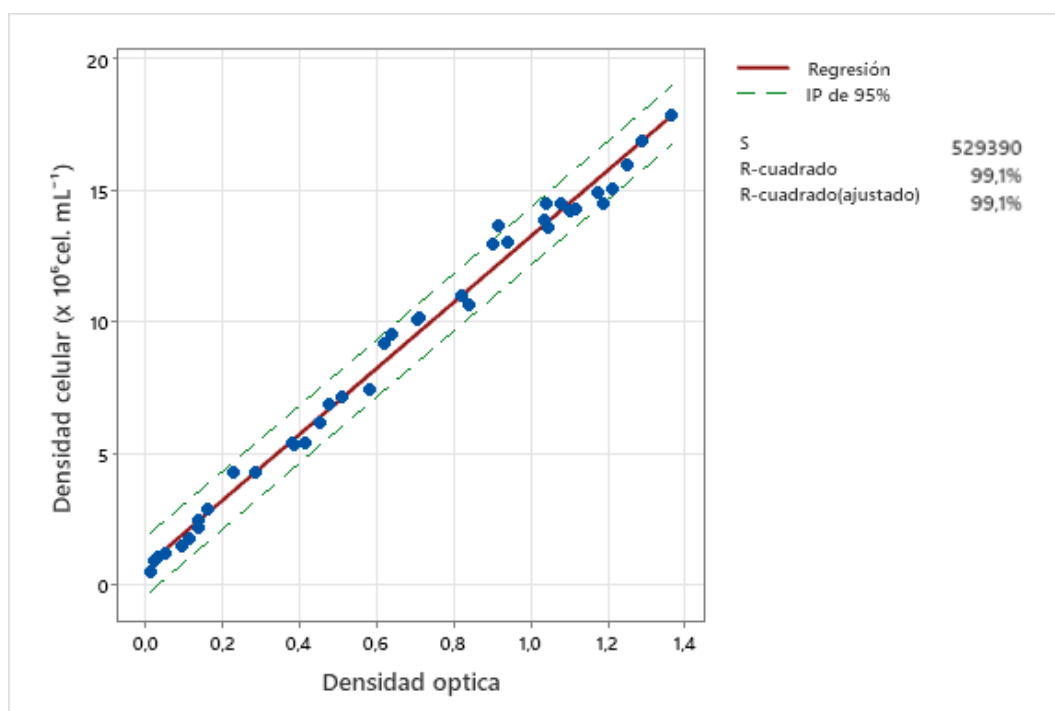
9.1.3. Relación de la densidad óptica y la densidad celular

Durante la etapa de estrés el crecimiento celular de *C. vulgaris* se determinó mediante la curva de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica, por espectrofotometría. Los resultados del análisis permitieron obtener un coeficiente de determinación de $R^2=0.9990$ representando una alta correlación entre ambas mediciones. La regresión lineal generó una ecuación que permite modelar y cuantificar la relación entre las variables de estudio (Figura 15). El modelo matemático determinado se define como:

$$\text{Densidad celular} = 713104 + 12520886 (\text{Densidad óptica})$$

Figura 15.

Curva de calibración entre la densidad óptica y densidad celular

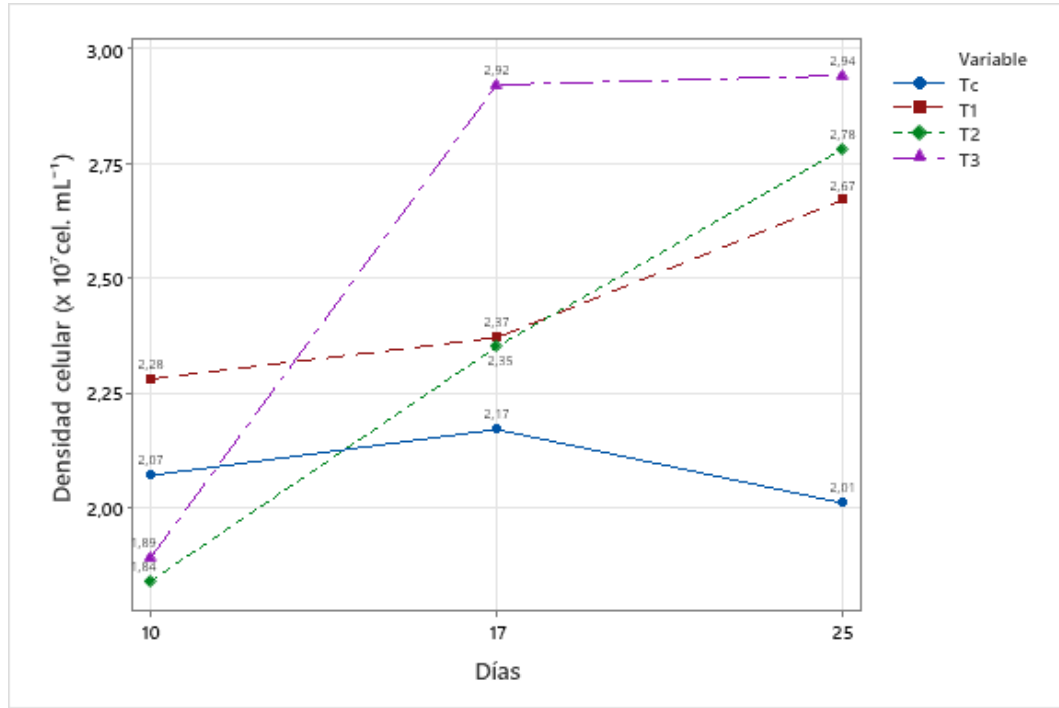


9.2.Efectos de los tratamientos experimentales bajo las condiciones de estrés

En condiciones estresantes del cultivo de *C. vulgaris* se analizó los cambios en la concentración celular, obteniendo densidades celulares teóricas de cada tratamiento, estimadas mediante el modelo generado de la regresión lineal. A diferencia de la fase vegetativa, se evaluó este cambio cada 7 días, empezando del día 0 de estrés, con un total de 3 muestras por tratamiento. Los datos mostraron que existe una diferencia entre los sujetos de prueba como se observa en la Figura 16, manteniendo una respuesta exponencial, T3 presentó una mayor densidad celular, alcanzando los $2.9 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$, seguido de T2 y T1 con $2.8 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ y $2.7 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$, respectivamente. Por el contrario, el Tc mostró un comportamiento de fase estacionaria e incluso se mantuvo en fase de muerte al final del experimento. Esta respuesta de las células ante los factores aplicados, evidencian que existió un efecto que alteró el crecimiento celular.

Figura 16.

Densidades celulares durante la etapa de estrés.

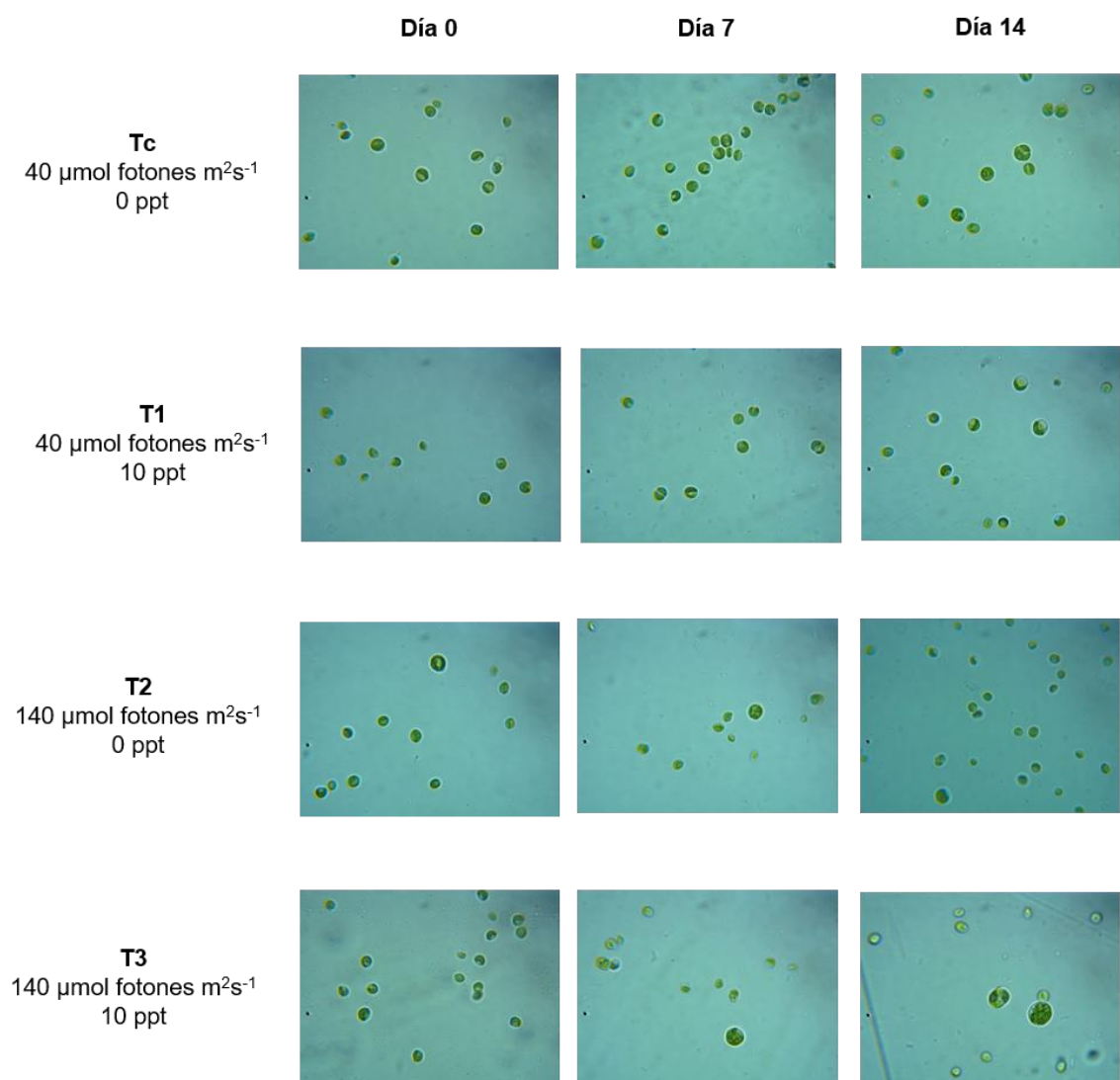


Se tomaron registros fotográficos de la evolución de las células sometidas a los diferentes factores experimentales. En la Figura 17, se observa el cambio durante un periodo de 14 días que duró el experimento. Si bien en todos los tratamientos se mantuvo la forma esférica u ovoide, hasta el día 14, se distinguió cierta variación en el volumen celular, además de la aparición de estructuras refringentes en el citoplasma de ciertas células, aludiendo que se produjo una posible síntesis de vacuolas de reserva o respuesta fotoprotectora. El T3 y T1 presentaron un ligero aumento en el tamaño celular a comparación del Tc; T2, por el contrario, mantuvo células de menor tamaño que el Tc. Estas respuestas morfológicas se relacionan a

una respuesta homeostática y estrés osmótico, que altera la turgencia y estabilidad de la membrana citoplasmática.

Figura 17.

Vista microscópica de células de C. vulgaris, durante la etapa de estrés bajo diferentes intensidades lumínicas y salinidades

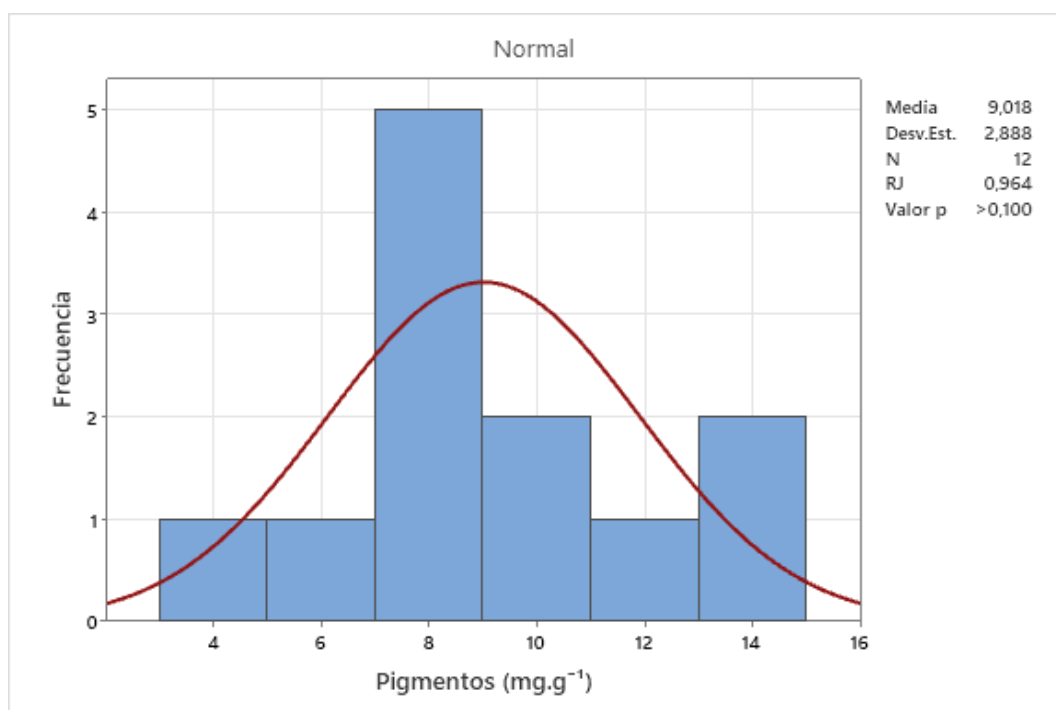


9.2.1. Análisis estadísticos

Previo al análisis de varianzas, se aplicó las pruebas de normalidad Shapiro-Wilks y de homogeneidad de Levene, con un grado de significancia del 95%. Los datos siguieron una distribución normal con un valor de $p > 0.10$, superior al nivel de significancia, aceptando la hipótesis nula de normalidad, como se muestra en la Figura 18. Posteriormente, se aplicó la prueba paramétrica de ANOVA factorial 2x2. Por otro lado, la prueba de Levene demostró homogeneidad con un valor de $p=0.556$.

Figura 18.

Normalidad de los datos de carotenos totales.



El análisis de varianzas (Tabla 5) demostró que existen diferencias significativas, con respecto al efecto de cada factor y su interacción. El factor

salinidad, intensidad lumínica y la interacción indican efectos significativos con un valor de p de 0.005, 0.001 y 0.003, respectivamente. Ambos factores, aplicados de forma individual y combinada, influyen significativamente en la acumulación de carotenos totales. Por lo que, se procedió a aplicar la prueba de comparación de Tukey, para reconocer diferencias entre los tratamientos.

Tabla 5.

Análisis de varianzas factorial 2x2.

	Fuentes de variación (F.V.)	S.C.	G.L.	C.M.	F0	F crítica	Valor P
	Bloques	13,43	2	6,71	7,41	5,143	0,024
Efecto A	A: Salinidad	16,69	1	16,69	18,43	5,987	0,005
Efecto B	B: Intensidad lumínica	33,90	1	33,90	37,44	5,987	0,001
Efecto AB	Interacción	22,28	1	22,28	24,60	5,987	0,003
Error experimental	Error	5,43	6	0,91			
Total	Total	91,72	11				

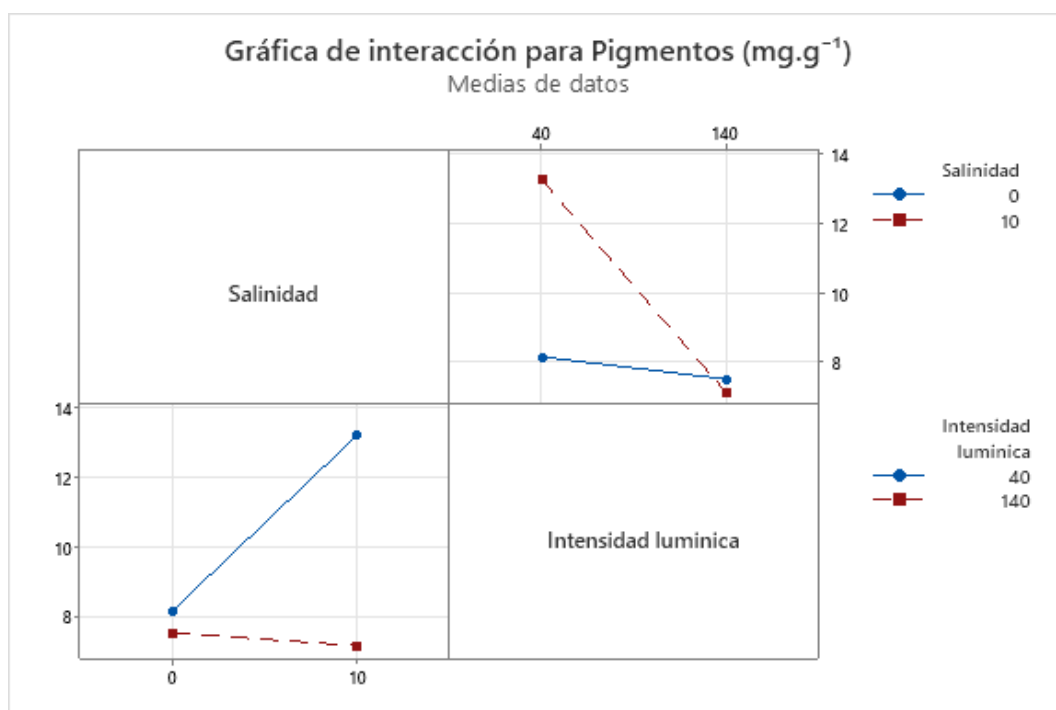
Nota: Se muestran los resultados del ANOVA, con SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio.

El análisis de varianza indica que la interacción entre la salinidad y la intensidad lumínica fue altamente significativa, aludiendo que el efecto de uno de los factores para la producción de carotenos depende del factor contrario. En la Figura 19, se observa que a 10 ppt y 40 $\mu\text{mol fotones m}^2\text{s}^{-1}$, existió un cambio

notorio y la media de datos es más alto en comparación a los demás tratamientos, siendo de 13.2 mg.g^{-1} . Por el contrario, cuando el factor intensidad lumínica es alta, la media de datos desciende a un valor de 7.2 mg.g^{-1} . Respecto al nivel de 0 ppt de salinidad, se observa un comportamiento medianamente estable, sin diferencias entre los niveles de intensidad lumínica, con el nivel bajo la media se encuentra en 8.2 mg.g^{-1} y en el nivel más alto se encuentra en 7.5 mg.g^{-1} , indicando un acercamiento entre datos, sin diferencias notables.

Figura 19.

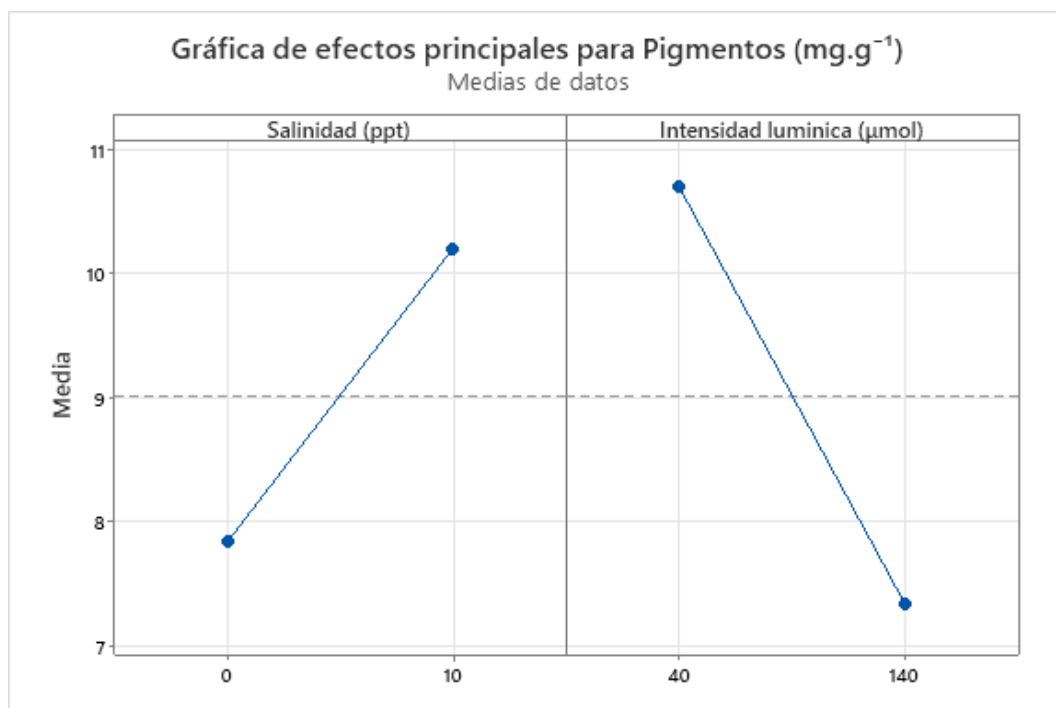
Interacción de factores y la media de carotenos totales



Es así como, las medias entre tratamientos mostraron que a menor intensidad lumínica y mayor salinidad se favorece la producción de carotenos, por su efecto combinado. Esto se muestra en la Figura 20, donde la línea de tendencia se inclina y aumenta su recorrido en función al nivel de cada factor con su mayor rendimiento. Respecto al factor lumínico la tendencia aumenta en su nivel más bajo, teniendo una media de 10.69 mg.g^{-1} y el factor salinidad aumentó en su nivel más alto con 10.19 mg.g^{-1} .

Figura 20.

Efectos principales de los factores intensidad luminosa y salinidad.



9.2.2. Comparación entre tratamientos

Para identificar los tratamientos con una mayor diferencia significativa, se aplicó una prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia de $p = 0.05$, que se muestra en la Tabla 6. Se demostró que el T1, con un nivel de intensidad lumínico bajo y nivel de salinidad alto, alcanzó la media de datos mayor en comparación con los otros tratamientos, siendo una media de $13.24 \pm 1,310$ mg.g⁻¹ de carotenos totales de peso seco, y el único tratamiento dentro del Grupo A, indicando una producción de carotenos superior a los agrupados dentro del Grupo B (Tc, T2, y T3) evidenciando que no existió una diferencia estadísticamente significativa entre ellas.

Tabla 6.

Prueba de Tukey, medias y agrupaciones.

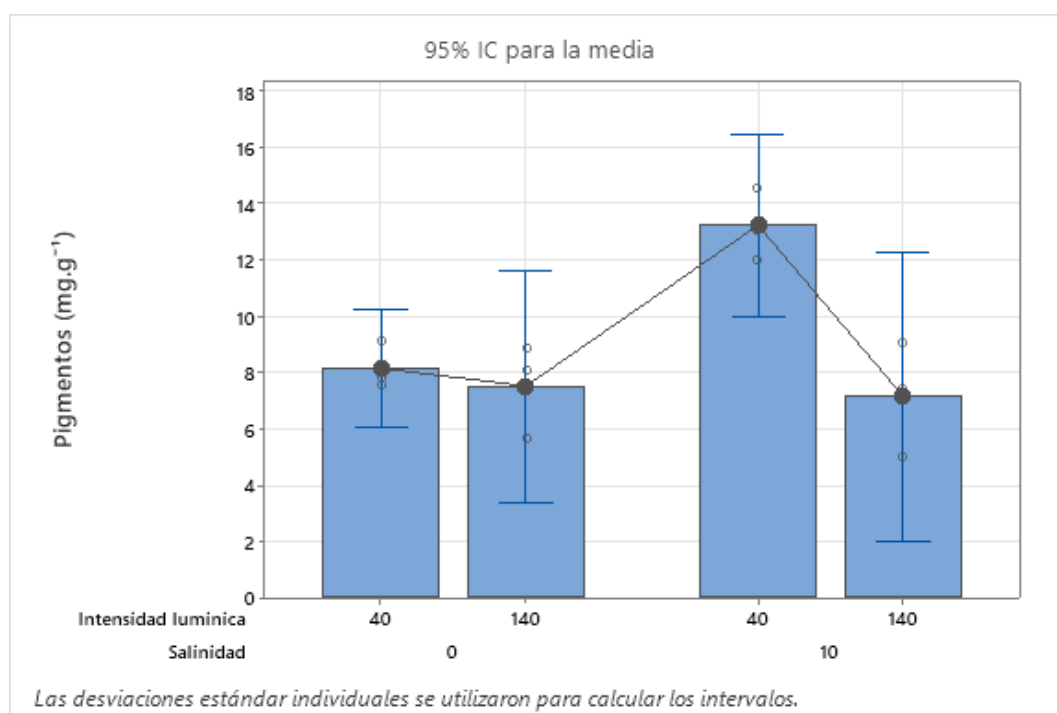
Tratamientos	N	Media	Desviación estándar	Agrupación
Tc	3	8,16	0,85	B
T1	3	13,24	1,30	A
T2	3	7,52	1,66	B
T3	3	7,15	2,06	B

Para sostener esta prueba estadística, se deben diferenciar el intervalo de las medias de cada tratamiento y sus varianzas. La Figura 21, muestra que T1 mantuvo la media de los datos mayor en comparación a los demás tratamientos evaluados. El tratamiento 1 con el factor salino de nivel mayor (10 ppt) y el factor intensidad lumínico de nivel menor ($40 \mu\text{mol fotones m}^2\text{s}^{-1}$) fue el que produjo un efecto

positivo en la acumulación de carotenos totales en la cepa nativa *C. vulgaris*. Al contrario de los demás tratamientos, el efecto del estrés salino no se produce al incrementarse la intensidad luminica ($140 \mu\text{mol fotones m}^2\text{s}^{-1}$). Ante la combinacion de estos factores el contenido de carotenos se vuelve equivalente entre T3, T2 y Tc, presentando medias de 7.15, 7.52, 8.16 mg.g^{-1} , respectivamente.

Figura 21.

Intervalos de confianza de las medias de carotenoides (mg.g^{-1} por peso seco) de los diferentes tratamientos.



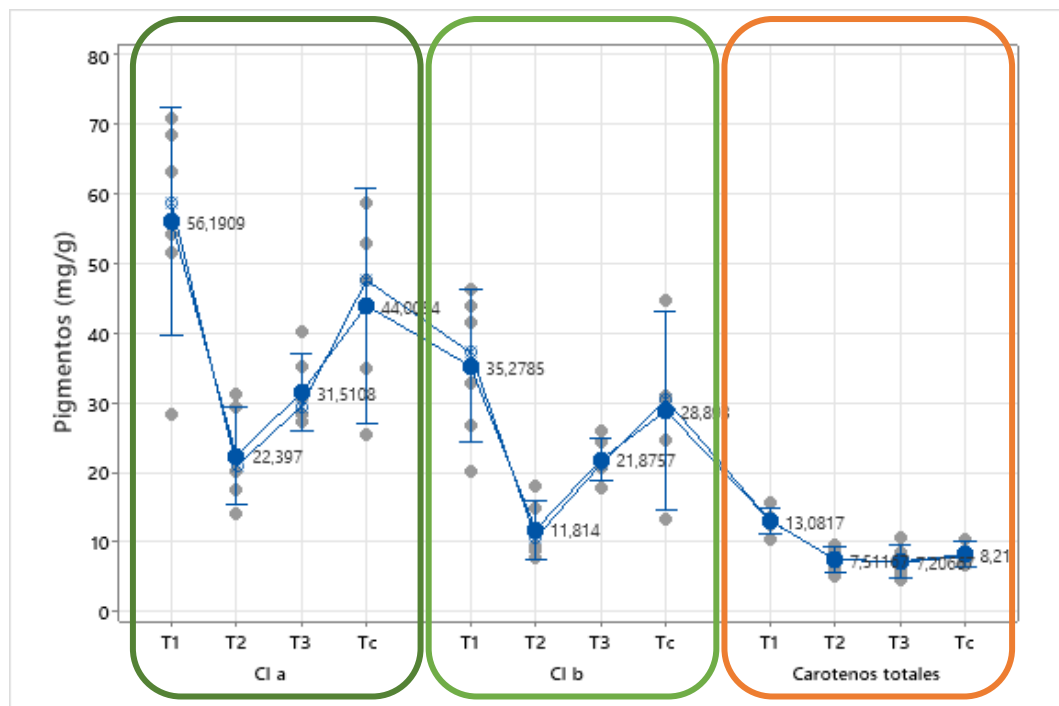
9.3.Biosíntesis de pigmentos

La producción total de pigmentos de los cultivos se observa en la Figura 22, muestra la concentración de Clorofila α (Cl- α), Clorofila β (Cl- β) y carotenos totales (CT) en los diferentes tratamientos. Para Cl- α , la cuantificación indicó

que T1, Tc, T3 y T2 produjeron concentraciones de 56.19, 44.81, 31.51 y 22,40 mg.g⁻¹, respectivamente. Así mismo, para Cl-β, el T1 se caracterizó por producir 35.28 mg/g, mayor en comparación a los demás tratamientos, que fueron seguidos por Tc con 28.89 mg.g⁻¹, T3 con 21.88 mg.g⁻¹ y T2 con 11.81 mg.g⁻¹. En el caso de CT, el T1 es el que presenta mayor concentración con 13.08 mg.g⁻¹ de pigmento, seguido de Tc, T3 y T2, con concentraciones de 8.21, 7.71 y 7.20 mg.g⁻¹.

Figura 22.

Contenido de pigmentos de las muestras según el tratamiento aplicado.



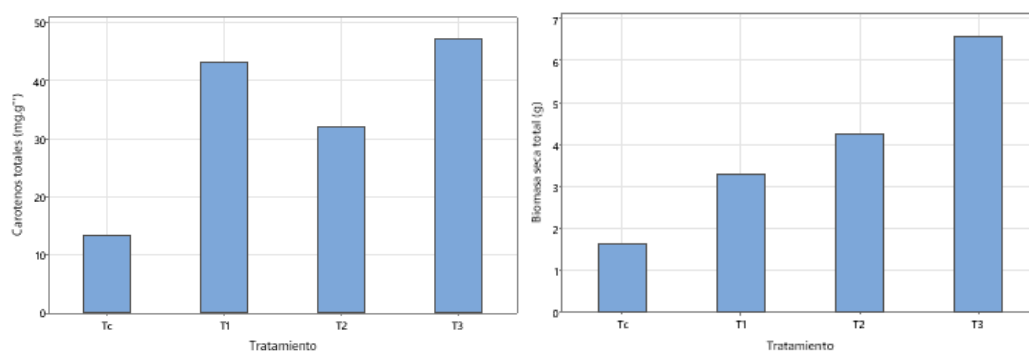
Nota: Se muestran las medias de las muestras para Cl a, Cl β y carotenos totales (Puntos azules), las réplicas experimentales (puntos grises) y sus valores mínimos y máximos.

Considerando los tres ciclos de producción (9L) al finalizar la experimentación se obtuvo la biomasa seca total de cada tratamiento y la concentración de carotenos totales. Por lo tanto, se estima a escala los datos

obtenidos para cada tratamiento en base al peso seco de cada tratamiento. En la Figura 23, se identificó que el tratamiento T3 presentó la mayor producción de biomasa seca (6570 mg) y de Carotenos Totales (47.35 mg.g⁻¹), revelando que la combinación de los factores de estrés aplicados favorece simultáneamente el crecimiento y la acumulación de pigmentos. A comparación del tratamiento T1 que, si bien genero la mayor cuantificación de carotenos, en base a la obtención de biomasa seca, es menor (43,17 mg.g⁻¹ en 3300 mg) a la generada por el tratamiento T3. En los casos del tratamiento T2 y Tc generaron una menor acumulación de carotenos siendo de 32,10 mg.g⁻¹ en 4260 mg y 13.46 mg.g⁻¹ en 1640 mg, respectivamente.

Figura 23.

Gráfica de Carotenos totales y Biomasa seca total por cada tratamiento



Nota: Valores de A) Biomasa seca total y B) Carotenos totales de las tres corridas experimentales.

Se debe tener en cuenta que de los tres ciclos de producción establecidos se obtuvo los valores ya mencionados, por lo que cabe indicar que para la aplicación de estos factores en cultivos masivos se deben considerar el objetivo de la producción.

10.DISCUSIONES

Los parámetros cinéticos reportados en la presente investigación mostraron un óptimo crecimiento en cultivos de *C. vulgaris*, obteniendo parámetros de cultivos de pH, temperatura y tasa de crecimiento específica ($0.21 \mu, d^{-1}$) y un tiempo de duplicación (t_d) de 3.16 días, similares a los reportados por Mtaki et al. (2021) que registraron una tasa de crecimiento específica (μ) de $0.209 d^{-1}$ a condiciones estables de cultivo. Adicionalmente, Haris et al. (2022) reportaron tasa de crecimiento específica de $0.206 \mu, d^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 2,08 día, en una cepa aislada nativa a condiciones estables de cultivo, logrando, además, alcanzar la fase exponencial entre los días 3 y 10 de cultivo, similar al que se obtuvo en la curva de crecimiento de la cepa PM022. Si bien comparten similitud en estos parámetros cinéticos, en cuanto a la (P) obtenida fue menor siendo de $0.454 mgL^{-1} día^{-1}$ a comparación de las registradas en ambos estudios ($0,17 gL^{-1} día^{-1}$). Estas diferencias se pueden atribuir al lugar del estudio, a la cepa utilizada, si bien fue una especie de *C. vulgaris*, no mantendrá las mismas características de cultivo que una cepa nativa de Santa Elena.

Durante la fase de estrés el Tratamiento 3 (T3) alcanzó la mayor densidad celular teórica equivalente a 29.4×10^6 cel/mL, valor similar a lo reportado por Haris et al. (2022) que a las mismas condiciones de salinidad (10 ppt) en la misma especie alcanzó una densidad de $31,17 \times 10^6$ cel/mL Indicando que a

concentraciones moderadas de salinidad favorece el crecimiento celular y posee la capacidad de generar mecanismos de defensa ante el estrés salino.

En cuanto a la producción de pigmentos para T1 se obtuvieron valores de 56.19, 35.28 y 13.08 mg/g para Cl- α , Cl- β y CT, respectivamente. Estos resultados coinciden con los rangos de producción de pigmentos reportados por Khumngern et al. (2025) que evaluaron el efecto interactivo entre la salinidad y la intensidad de luz sobre la producción de biocompuestos en una especie del género *Chlorella sp*, obteniendo valores de 10-50 y 4-18 mg.g⁻¹ de clorofilas y carotenoides, respectivamente, demostraron que el contenido de carotenos totales se altera a medida que se aplican diferentes intensidades de estos factores, alcanzando valores máximos de CT bajo intensidad lumínica y salinidad moderada (5000 lux y 1% ppt).

Se evidenció que los tratamientos producen un efecto en el cultivo de *C. vulgaris*, tanto en la biosíntesis de pigmentos, como en la generación de biomasa celular. Esto hace alusión a que las células toman ciertos mecanismos de defensa ante factores estresantes. Kaur et al. (2022) indica que géneros de clorofitas como *Chlorella sp.* y *Dunaliella sp* poseen estrategias para afrontar

el estrés salino, *Chlorella vulgaris* al poseer una pared celular rígida acude a la producción de solutos orgánicos por osmorregulación.

En cuanto a los tratamientos con intensidad lumínica alta, no se observaron concentraciones de carotenos mayor a las obtenidas con la intensidad baja. Por lo que, sosteniendo la idea Maltsev et al. (2021) se puede aludir que, si bien una exposición a intensidad de luz alta aumenta la producción de carotenos, esto solo se evidencia en ciertas microalgas como *Haematococcus lacustris*, *Dunaliella salina*, *Chromochloris zofingiensis*, *Tetrademus obliquus*, *Nostoc calcicola*. Además, indican que cultivos sometidos a luz baja y estrés salino acumularán carotenos.

Existe un efecto fenotípico, en la morfología de las células, evidenciado en el Tratamiento 1 y el Tratamiento 3, con el aumento en el tamaño celular, a diferencia del Tratamiento control y el Tratamiento 2, que el tamaño celular se mantuvo sin variaciones entre sí. Jiao et al. (2025) observó cambios morfológicos a medida que aumentaba la salinidad en *Scenedesmus obliquus*, siendo que a salinidades moderadas (10 y 20 ppt) aumentaba el tamaño celular. Sugiere que niveles de salinidad desencadenan estrés osmótico, provocando

cambios en el tamaño, forma e incluso el contenido intracelular de las células para mantener la homeostasis.

El tratamiento T1, presentó el mayor contenido de carotenos totales. Los tratamientos Tc, T2 y T3 mostraron menores concentraciones. Esta dinámica sugiere que, bajo los factores estresantes aplicados, una mayor concentración de las clorofilas puede estar asociado a una mayor síntesis de carotenos. Lo que concuerda con Bazarnova et al. (2022) quienes observaron una tendencia similar al comparar sus tratamientos con mayores concentraciones de Cl- α de 24.7 mg/g, Cl- β de 11 mg/g en conjunto con un mayor contenido de CT de 7 mg/g, comparado con los tratamientos con menores concentraciones de clorofilas que registraron un menor contenido de carotenos totales (Cl- α : 13 mg.g⁻¹; Cl- β : 4.8 mg.g⁻¹; CT: 3.7 mg.g⁻¹). Si bien las concentraciones difieren entre ambos estudios, se observó un patrón y tendencia similar, aludiendo que existe una asociación entre el contenido de clorofilas y la acumulación de carotenos totales.

Se obtuvo la biomasa seca unificada para cada tratamiento de los ciclos de producción, siendo T3 el de mayor acumulación con 6.57 g de polvo de microalgas se obtiene 47.35 mg.g⁻¹ de pigmentos carotenoides. Indicando que, si bien existe una mayor cuantificación en uno de los tratamientos, la

concentración final proporcional al peso total seco va a diferir, siendo una mayor obtención de carotenos a mayor biomasa de polvo de microalgas. Esto concuerda con Chen et al. (2021) que obtuvo la biomasa total de sus tratamientos presentaron que en 10 g de polvo de microalgas de *S. obliquus* obtendrá 61 mg.g⁻¹ de luteína, al contrario del tratamiento con menor biomasa de 4.26 g que obtuvo 9,79 mg.g⁻¹. Por lo que, se evidencia que mayor concentración de biomasa seca se obtendrá una mayor producción de pigmentos.

Para la producción acuícola se debe tomar en consideración los gramos de biomasa seca, los volúmenes, tiempo de producción y las condiciones que potencien la capacidad de obtención de pigmentos carotenoides.

11.CONCLUSIONES

- La cepa PM022 identificada molecularmente como *Chlorella vulgaris* es capaz de alcanzar su pico de generación de biomasa bajo los parámetros establecidos de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, pH y fotoperiodo, generando así un protocolo base de cultivo para esta cepa nativa de Santa Elena. Considerando que se puede optimizar los factores de crecimiento, para aumentar la productividad de su biomasa y el rendimiento celular.
- El aumento de los factores de estudio produjo una disminución en la obtención de pigmentos. La biosíntesis de carotenos totales se ve influenciada por rangos de estrés optimizados que al incremento en las intensidades de los estresores. A pesar de que T1 fue el tratamiento con 10 ppt, no representa una intensidad extremadamente alta, sigue siendo moderada y mantuvo la capacidad de producir más pigmentos. A diferencia de T3 con $140 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y 10 ppt se limitó la acumulación de carotenoides. Pero existió una mayor obtención de pigmentos carotenoides de los ciclos de producción.

- La extracción con etanol al 95%, permitió obtener extractos pigmentarios de manera eficiente, evidenciando variaciones significativas según el régimen de cultivo aplicado para maximizar la concentración intracelular de carotenoides, el T1 representó la mejor alternativa, mientras que el T3 optimizo tanto la producción de biomasa seca como el rendimiento total de pigmentos por ciclo de cultivo. Estos enfoques ofrecen estrategias operativas diferenciadas y escalables según los requerimientos del proceso industrial.

12.RECOMENDACIONES

- Aumentar el rendimiento de la cepa PM022 empleando medios de cultivo comerciales o modificados.
- Optar por otros métodos de extracción de carotenos totales, específicos y selectivos.
- Aplicar diferentes concentraciones de NaCl a las empleadas en el estudio.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abubakar, A. L., & Lawal, A. (2023). Carotenoids and nutraceuticals production from green microalgae (*Dunaliella* and *Chlorella*). *Nigerian Journal of Basic and Applied Sciences*, 31(2), 91–96. <https://doi.org/10.4314/NJBAS.V31I2.13>
2. Adams, C., Godfrey, V., Wahlen, B., Seefeldt, L., & Bugbee, B. (2013). Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. *Bioresource Technology*, 131, 188–194. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.12.143>
3. Aderemi, A., Hunter, C., Pahl, O., & Shu, X. (2015). Optimization of cell disruption in *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris* for biomarker evaluation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4, 481–484. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2015.4.6.481-484>
4. Aditi, Bhardwaj, R., Yadav, A., Swapnil, P., & Meena, M. (2025). Characterization of microalgal β -carotene and astaxanthin: exploring their health-promoting properties under the effect of salinity and light intensity. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2025 18:1, 18(1), 18-. <https://doi.org/10.1186/S13068-025-02612-X>
5. Aguilar, D., Benavente, J., Méndez, A., & Montañez, J. (2015). Effect of salt-stress on the production of pigments by *Chlorella*

sorokiniana under photoheterotrophic culture. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería* At: Guadalajara, Jalisco, 1.

https://www.researchgate.net/publication/285783098_Effect_of_salt-stress_on_the_production_of_pigments_by_Chlorella_sorokiniana_under_photoheterotrophic_culture

6. Ahmad, M. T., Shariff, M., Md. Yusoff, F., Goh, Y. M., & Banerjee, S. (2020). Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12(1), 328–346.
<https://doi.org/10.1111/RAQ.12320>
7. Alagawany, M., Taha, A. E., Noreldin, A., El-Tarabily, K. A., & Abd El-Hack, M. E. (2021). Nutritional applications of species of *Spirulina* and *Chlorella* in farmed fish: A review. *Aquaculture*, 542, 736841.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736841>
8. Ali, H. E. A., El-fayoumy, E. A., Rasmy, W. E., Soliman, R. M., & Abdullah, M. A. (2021). Two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light and salt stress conditions for simultaneous production of lipid, carotenoids, and antioxidants. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 227–239.
<https://doi.org/10.1007/S10811-020-02308-9>

9. Almendinger, M., Saalfrank, F., Rohn, S., Kurth, E., Springer, M., & Pleissner, D. (2021). Characterization of selected microalgae and cyanobacteria as sources of compounds with antioxidant capacity. *Algal Research*, 53, 102168. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2020.102168>
10. Almutairi, A. W., El-Sayed, A. E. K. B., & Reda, M. M. (2021). Evaluation of high salinity adaptation for lipid bio-accumulation in the green microalga *Chlorella vulgaris*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(7), 3981–3988. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.04.007>
11. Al-Nassar, H. M., & Alzurfi, S. K. L. (2024). Effect of temperature and light spectrum on the Lutein and Beta-carotenoids production in *Chlorella vulgaris* algae. *International Journal of Aquatic Biology*, 12(2), 163–170. <https://doi.org/10.22034/IJAB.V12I2.2150>
12. Arredondo Vega, B. O., & Voltolina Lobina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. 17–19. <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1403>
13. Azaman, S. N. A. (2016). *Morphological, biochemical and transcriptomic characterisation of Chlorella sorokiniana AND Chlorella zofingiensis during normal and stress conditions*

[Universiti Putra Malaysia].

<https://etheses.whiterose.ac.uk/id/eprint/19718/>

14. Aziz, M. M. A., Kassim, K. A., Shokravi, Z., Jakarni, F. M., Lieu, H. Y., Zaini, N., Tan, L. S., Islam, S., & Shokravi, H. (2020). Two-stage cultivation strategy for simultaneous increases in growth rate and lipid content of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 119, 109621. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2019.109621>
15. Bazarnova, J., Smyatskaya, Y., Shlykova, A., Balabaev, A., & Đurović, S. (2022). Obtaining Fat-Soluble Pigments—Carotenoids from the Biomass of *Chlorella* Microalgae. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 3246, 12(7), 3246. <https://doi.org/10.3390/APP12073246>
16. Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016a). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
17. Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H., & Shariff, M. (2016b). Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), 2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>

18. Ben-Amotz, A. (1993). Production of β -Carotene and Vitamins by the Halotolerant Alga *Dunaliella*. *Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, 411–417.
https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2391-2_11
19. Bermejo, R., Acién, F. G., Ibáñez, M. J., Fernández, J. M., Molina, E., & Alvarez-Pez, J. M. (2003). Preparative purification of B-phycoerythrin from the microalga *Porphyridium cruentum* by expanded-bed adsorption chromatography. *Journal of Chromatography B*, 790(1–2), 317–325.
[https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00168-5)
20. Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10), 3425–3431.
<https://doi.org/10.1016/J.APENERGY.2010.12.064>
21. Borowitzka, M. A. (2013). High-value products from microalgae—their development and commercialisation. *Journal of Applied Phycology* 2013 25:3, 25(3), 743–756.
<https://doi.org/10.1007/S10811-013-9983-9>
22. Calijuri, M. L., Silva, T. A., Magalhães, I. B., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Assis, L. R. de, & Lorentz, J. F. (2022). Bioproducts from microalgae biomass: Technology, sustainability, challenges and opportunities. *Chemosphere*, 305,

135508.

<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.135508>

23. Champenois, J., Marfaing, H., & Pierre, R. (2015). Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology*, 27(5), 1845–1851. <https://doi.org/10.1007/S10811-014-0431-2>
24. Chen, J. H., Kato, Y., Matsuda, M., Chen, C. Y., Nagarajan, D., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2021). Lutein production with *Chlorella sorokiniana* MB-1-M12 using novel two-stage cultivation strategies – metabolic analysis and process improvement. *Bioresource Technology*, 334, 125200. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125200>
25. Chettri, S., Altemimi, A. B., Das, P., Singh, R., Said, P. P., Chandra Nath, P., Pandey, V. K., & Rustagi, S. (2026a). Recent advances in microalgal pigments as a source of natural colors and their application in next-generation functional foods. *Sustainable Food Technology*, 4(2), 1350–1371. <https://doi.org/10.1039/D5FB00537J>
26. Chettri, S., Altemimi, A. B., Das, P., Singh, R., Said, P. P., Chandra Nath, P., Pandey, V. K., & Rustagi, S. (2026b). Recent advances in microalgal pigments as a source of natural colors and their application in next-generation functional foods. *Sustainable*

Food Technology, 4(2), 1350–1371.

<https://doi.org/10.1039/D5FB00537J>

27. Chew, K. W., Chia, S. R., Show, P. L., Yap, Y. J., Ling, T. C., & Chang, J. S. (2018). Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 91, 332–344. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2018.05.039>
28. Chhandama, M. V. L., Ruatpuia, J. V. L., Ao, S., Chetia, A. C., Satyan, K. B., & Rokhum, S. L. (2023). Microalgae as a sustainable feedstock for biodiesel and other production industries: Prospects and challenges. *Energy Nexus*, 12, 100255. <https://doi.org/10.1016/J.NEXUS.2023.100255>
29. Cordero, B. F., Couso, I., Leon, R., Rodriguez, H., & Vargas, M. A. (2012). Isolation and characterization of a lycopene ϵ -cyclase gene of *Chlorella* (Chromochloris) *zofingiensis*. Regulation of the carotenogenic pathway by nitrogen and light. *Marine Drugs*, 10(9), 2069–2088. <https://doi.org/10.3390/MD10092069>
30. Coulombier, N., Nicolau, E., Le Déan, L., Barthelemy, V., Schreiber, N., Brun, P., Lebouvier, N., & Jauffrais, T. (2020). Effects of Nitrogen Availability on the Antioxidant Activity and Carotenoid Content of the Microalgae *Nephroselmis* sp. *Marine Drugs*, 18(9). <https://doi.org/10.3390/MD18090453>

31. Cunningham, F. X., & Gantt, E. (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 557–583.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.49.1.557>
32. da Silva, A. A., & Fonseca, G. G. (2018). Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using a microplate assay. *Acta Scientiarum - Biological Sciences*, 40(1).
<https://doi.org/10.4025/ACTASCIBIOLSCI.V40I1.39401>
33. de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. de O., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A., & Ramos, S. R. R. (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins (*Cucurbita moschata* Duch): A preliminary study. *Food Research International*, 47(2), 337–340.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2011.07.040>
34. Dimopoulou, M., Kolonas, A., Stagos, D., & Gortzi, O. (2025a). A Review of the Sustainability, Chemical Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant and Antidiabetic Activity, Neuroprotective Properties, and Health Benefits of Microalgae. *Biomass* 2025, Vol. 5, Page 11, 5(1), 11.
<https://doi.org/10.3390/BIOMASS5010011>

35. Dimopoulou, M., Kolonas, A., Stagos, D., & Gortzi, O. (2025b). A Review of the Sustainability, Chemical Composition, Bioactive Compounds, Antioxidant and Antidiabetic Activity, Neuroprotective Properties, and Health Benefits of Microalgae. *Biomass* 2025, Vol. 5, Page 11, 5(1), 11. <https://doi.org/10.3390/BIOMASS5010011>
36. Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389–406. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2005.02.006>
37. El-fayoumy, E. A., Ali, H. E. A., Elsaid, K., Elkhayat, A., Al-Meer, S., Rozaini, M. Z. H., & Abdullah, M. A. (2024). Co-production of high density biomass and high-value compounds via two-stage cultivation of *Chlorella vulgaris* using light intensity and a combination of salt stressors. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 14(18), 22673–22686. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-04442-Z/FIGURES/6>
38. El-Sayed, A. (2004). *Circulation of Quaron Lake wastes. II-Growth of Scenedesmus sp. under Mg residences*. 17, 477–485. https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl

=en&user=kEnF2M4AAAAJ&cstart=20&pagesize=80&citation
_for_view=kEnF2M4AAAAJ:u-x6o8ySG0sC

39. El-Sayed, A. B. (2004). Screening and growth characterization of the green life stock of drill water from Jeddah, Saudi Arabia. I- Isolation and growth characterization of *Scenedesmus* sp. *New Egyptian Journal of Microbiology*, 8, 376–385.
https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=en&user=kEnF2M4AAAAJ&cstart=20&pagesize=80&citation_for_view=kEnF2M4AAAAJ:4fKUyHm3Qg0C
40. Ezquerra-Brauer, J. M., & Chan-Higuera, J. E. (2021). Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos. *CienciaUAT*, 186–197.
<https://doi.org/10.29059/CIENCIAUAT.V15I2.1501>
41. Fal, S., Aasfar, A., Rabie, R., Smouni, A., & Arroussi, H. EL. (2022). Salt induced oxidative stress alters physiological, biochemical and metabolomic responses of green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Heliyon*, 8(1), e08811.
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E08811>
42. Farobie, O., Anis, L. A., Nurcahyani, P. R., Hartulistiyoso, E., Rahman, D. Y., Fatriasari, W., Nafisyah, A. L., Amrullah, A., & Aziz, M. (2023). Extraction of Bio-pigments from the Green Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* under Different Solvent

- Ratios. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1187. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1187/1/012009>
43. Fatemeh, L., & Mohsen, D. (2016). Effects of Environmental Factors on the Growth, Optical Density and Biomass of the Green Algae *Chlorella Vulgaris* in Outdoor Conditions. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 20(1), 133. <https://doi.org/10.4314/JASEM.V20I1.16>
44. Fernandez-Valenzuela, S., Chávez-Ruvalcaba, F., Beltran-Rocha, J. C., San Claudio, P. M., & Reyna-Martínez, R. (2021). Isolation and Culturing Axenic Microalgae: Mini-Review. *The Open Microbiology Journal*, 15(1), 111–119. <https://doi.org/10.2174/1874285802115010111>
45. Gong, M., & Bassi, A. (2016). Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnology Advances*, 34(8), 1396–1412. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2016.10.005>
46. Gouveia, L., Veloso, V., Reis, A., Fernandes, H., Novais, J., & Empis, J. (1996). Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 57(2), 157–163. [https://doi.org/10.1016/0960-8524\(96\)00058-2](https://doi.org/10.1016/0960-8524(96)00058-2)
47. Guarín-Villegas, E., Remolina-Páez, L. M., Bermúdez-Castro, J. P., Mogollón-Londoño, S. O., Contreras-Ropero, J. E., García Martínez, J. B., & Barajas-Solano, A. F. (2020). Efecto de la

- relación carbono/Nitrógeno en la producción de carotenoids en microalgas. *Ingeniería y Competitividad*, 22(1). <https://doi.org/10.25100/IYC.V22I1.8811>
48. Guedes, A. C., Amaro, H. M., & Malcata, F. X. (2011). Microalgae as Sources of Carotenoids. *Marine Drugs*, 9(4), 625. <https://doi.org/10.3390/MD9040625>
49. Haris, N., Manan, H., Jusoh, M., Khatoon, H., Katayama, T., & Kasan, N. A. (2022). Effect of different salinity on the growth performance and proximate composition of isolated indigenous microalgae species. *Aquaculture Reports*, 22, 100925. <https://doi.org/10.1016/J.AQREP.2021.100925>
50. Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., & García-González, M. C. (2013). Treatment of agro-industrial wastewater using microalgae–bacteria consortium combined with anaerobic digestion of the produced biomass. *Bioresource Technology*, 135, 598–603. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2012.09.029>
51. Hoshina, R., & Fujiwara, Y. (2013). Molecular characterization of *Chlorella* cultures of the National Institute for Environmental Studies culture collection with description of *Micractinium inermum* sp. nov., *Didymogenes sphaerica* sp. nov., and *Didymogenes soliella* sp. nov. (Chlorellaceae, Trebouxiophyceae). *Phycological Research*, 61(2), 124–132. <https://doi.org/10.1111/PRE.12010>

52. Hu, J., Nagarajan, D., Zhang, Q., Chang, J. S., & Lee, D. J. (2018). Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnology Advances*, 36(1), 54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
53. Indrayani, I., Egeland, E. S., Moheimani, N. R., & Borowitzka, M. A. (2022). Carotenoid production of *Botryococcus braunii* CCAP 807/2 under different growth conditions. *Journal of Applied Phycology* 2022 34:3, 34(3), 1177–1188. <https://doi.org/10.1007/S10811-022-02682-6>
54. Iwamoto, H. (2003). Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products - Major Industrial Species: Chlorella. *Handbook of Microalgal Culture*, 253–263. <https://doi.org/10.1002/9780470995280.CH11>
55. Jiao, F., Ramarui, K., He, C., North, E. W., Li, Y., & Chen, F. (2025). Impact of salinity on morphology, growth, and pigment profiles of *Scenedesmus obliquus* HTB1 under ambient air and elevated CO₂ (10 %) conditions. *Algal Research*, 88, 104027. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2025.104027>
56. Josephine, A., Kumar, T. S., Surendran, B., Rajakumar, S., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2022). Evaluating the effect of various environmental factors on the growth of the marine microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMARS.2022.954622>

57. Juneja, A., Ceballos, R. M., & Murthy, G. S. (2013). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies* 2013, Vol. 6, Pages 4607-4638, 6(9), 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/EN6094607>
58. Kagawa, T., & Suetsugu, N. (2007). Photometrical analysis with photosensory domains of photoreceptors in green algae. *FEBS Letters*, 581(3), 368–374. <https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.12.041>
59. Kapaun, E., & Reisser, W. (1995). A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta*, 197(4), 577–582. <https://doi.org/10.1007/BF00191563>
60. Kaur, M., Saini, K. C., Ojah, H., Sahoo, R., Gupta, K., Kumar, A., & Bast, F. (2022). Abiotic stress in algae: response, signaling and transgenic approaches. *Journal of Applied Phycology*, 34(4), 1843–1869. <https://doi.org/10.1007/S10811-022-02746-7>
61. Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories* 2018 17:1, 17(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S12934-018-0879-X>
62. Khoo, K. S., Chew, K. W., Yew, G. Y., Leong, W. H., Chai, Y. H., Show, P. L., & Chen, W. H. (2020). Recent advances in

- downstream processing of microalgae lipid recovery for biofuel production. *Bioresource Technology*, 304, 122996. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2020.122996>
63. Khumngern, T., Cheirsilp, B., Maneechote, W., & Srinuanpan, S. (2025). Optimizing growth and pigment content of promising green microalgae and application of living microalgal cells as a sole practical diet for white shrimp larvae. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 13(3), 58–70. <https://doi.org/10.7324/JABB.2025.211147>
64. Kratzer, R., & Murkovic, M. (2021). Food Ingredients and Nutraceuticals from Microalgae: Main Product Classes and Biotechnological Production. *Foods*, 10(7), 1626. <https://doi.org/10.3390/FOODS10071626>
65. Krayem, M., Khatib, S. El, Hassan, Y., Deluchat, V., & Labrousse, P. (2021). In search for potential biomarkers of copper stress in aquatic plants. *Aquatic Toxicology*, 239, 105952. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2021.105952>
66. Kulkarni, S., & Nikolov, Z. (2018). Process for selective extraction of pigments and functional proteins from *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 35, 185–193. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.08.024>
67. Kumar, L., & Bharadvaja, N. (2024). A review on microalgae biofuel and biorefinery: challenges and way forward. *Energy*

Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects, 46(1), 16599–16622.
<https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1836084>

68. Kwak, H. S., Kim, J. Y. H., Woo, H. M., Jin, E. S., Min, B. K., & Sim, S. J. (2016). Synergistic effect of multiple stress conditions for improving microalgal lipid production. *Algal Research*, 19, 215–224. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2016.09.003>
69. Li, J., Zhu, D., Niu, J., Shen, S., & Wang, G. (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology Advances*, 29(6), 568–574. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2011.04.001>
70. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148(C), 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
71. Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11(5), 591–592. <https://doi.org/10.1042/BST0110591>
72. Lim, K. C., Yusoff, F. M., Karim, M., & Natrah, F. M. I. (2023). Carotenoids modulate stress tolerance and immune responses in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 15(2), 872–894. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12767>

73. Liu, Z., van den Berg, C., Weusthuis, R. A., Dragone, G., & Mussatto, S. I. (2021). Strategies for an improved extraction and separation of lipids and carotenoids from oleaginous yeast. *Separation and Purification Technology*, 257, 117946. <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2020.117946>
74. Liyanaarachchi, V. C., Premaratne, M., Ariyadasa, T. U., Nimarshana, P. H. V., & Malik, A. (2021). Two-stage cultivation of microalgae for production of high-value compounds and biofuels: A review. *Algal Research*, 57, 102353. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102353>
75. Luiten, E. E. M., Akkerman, I., Koulman, A., Kamermans, P., Reith, H., Barbosa, M. J., Sipkema, D., & Wijffels, R. H. (2003). Realizing the promises of marine biotechnology. *Biomolecular Engineering*, 20(4–6), 429–439. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00074-1](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00074-1)
76. Ma, X., & Jian, W. (2023). Growth Conditions and Growth Kinetics of *Chlorella Vulgaris* Cultured in Domestic Sewage. *Sustainability* 2023, Vol. 15, Page 2162, 15(3), 2162. <https://doi.org/10.3390/SU15032162>
77. Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition.

- Biology* 2021, Vol. 10, Page 1060, 10(10), 1060.
<https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10101060>
78. Matos, J., Cardoso, C., Bandarra, N. M., & Afonso, C. (2017). Microalgae as healthy ingredients for functional food: a review. *Food & Function*, 8(8), 2672–2685.
<https://doi.org/10.1039/C7FO00409E>
79. Mehariya, S., Plöhn, M., Leon-Vaz, A., Patel, A., & Funk, C. (2022). Improving the content of high value compounds in Nordic *Desmodesmus* microalgal strains. *Bioresource Technology*, 359.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127445>
80. Minhas, A. K., Hodgson, P., Barrow, C. J., & Adholeya, A. (2016). A review on the assessment of stress conditions for simultaneous production of microalgal lipids and carotenoids. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAY), 183978.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00546/XML>
81. Minitab. (2025). *¿Qué es el método de Tukey para comparaciones múltiples?*
82. Mostafa, H. S., & Hashem, M. M. (2024). Microalgae as a source of carotenoids in foods, obstacles and solutions. *Phytochemistry Reviews* 2024 24:5, 24(5), 4295–4337.
<https://doi.org/10.1007/S11101-024-10039-9>
83. Mostafa, H. S., & Hashem, M. M. (2025). Microalgae as a source of carotenoids in foods, obstacles and solutions. *Phytochemistry*

Reviews, 24(5), 4295–4337. <https://doi.org/10.1007/S11101-024-10039-9>

84. Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2021). Supplementing wastewater with NPK fertilizer as a cheap source of nutrients in cultivating live food (*Chlorella vulgaris*). *Annals of Microbiology*, 71(1). <https://doi.org/10.1186/S13213-020-01618-0>
85. Nagappan, S., Devendran, S., Tsai, P. C., Dahms, H. U., & Ponnusamy, V. K. (2019). Potential of two-stage cultivation in microalgae biofuel production. *Fuel*, 252, 339–349. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2019.04.138>
86. Němcová, Y., & Kalina, T. (2000). Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Algological Studies/Archiv Für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 100, 95–105. https://doi.org/10.1127/ALGOL_STUD/100/2000/95
87. Nisar, N., Li, L., Lu, S., Khin, N. C., & Pogson, B. J. (2015). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68–82. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2014.12.007>
88. Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., Okoh, A. I., & Koulen, P. (2017). Therapeutic Potentials of Microalgae in the Treatment of

- Alzheimer's Disease. *Molecules* 2017, Vol. 22, Page 480, 22(3), 480. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES22030480>
89. Pagels, F., Pereira, R. N., Vicente, A. A., & Guedes, A. C. (2021). Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria—A Review on Current Methodologies. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 5187, 11(11), 5187. <https://doi.org/10.3390/APP11115187>
90. Panahi, Y., Khosroshahi, A. Y., Sahebkar, A., & Heidari, H. R. (2019). Impact of Cultivation Condition and Media Content on *Chlorella vulgaris* Composition. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 182. <https://doi.org/10.15171/APB.2019.022>
91. Pandit, P. R., Fulekar, M. H., & Karuna, M. S. L. (2017). Effect of salinity stress on growth, lipid productivity, fatty acid composition, and biodiesel properties in *Acutodesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(15), 13437–13451. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-8875-Y>
92. Pardo, A. (2000). *Capítulo 15. Análisis de varianza factorial El procedimiento Modelo lineal general: Univariante*.
93. Parveen, A., Rawat, J., Bhatnagar, P., Gautam, P., Kumar, S., Upadhyay, S., Vlaskin, M. S., Anna I, K., Kumar, V., & Nanda, M. (2024). Enhanced production of high-value compounds from *Chlorella sorokiniana* by two-stage cultivation under red light

- and salinity stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 60, 103315. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2024.103315>
94. Parveen, S., Saeed, F., Farooq, F. B., Parveen, N., Idrees, N., Nasir, S., & Fanja, R. (2023). QSPR Modeling of Fungicides Using Topological Descriptors. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/9625588>
95. Pathak, N., & Singh, P. (2010). *Effect of different conditions on the production of chlorophyll by Spirulina platensis*.
96. Pignolet, O., Jubeau, S., Vaca-Garcia, C., & Michaud, P. (2013). Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(8), 781–796. <https://doi.org/10.1007/S10295-013-1281-7>
97. Pinto, A. S., Maia, C., Sousa, S. A., Tavares, T., & Pires, J. C. M. (2025). Amino Acid and Carotenoid Profiles of *Chlorella vulgaris* During Two-Stage Cultivation at Different Salinities. *Bioengineering*, 12(3), 284. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING12030284/S1>
98. Prates, J. A. M. (2025). Applications of Bioactive Compounds from Marine Microalgae in Health, Cosmetics, and Functional Foods. *Applied Sciences* 2025, Vol. 15, Page 6144, 15(11), 6144. <https://doi.org/10.3390/APP15116144>

99. Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635–648. <https://doi.org/10.1007/S00253-004-1647-X>,
100. Qazi, W. M., Ballance, S., Kousoulaki, K., Uhlen, A. K., Kleinegris, D. M. M., Skjånes, K., & Rieder, A. (2021). Protein enrichment of wheat bread with microalgae: *Microchloropsis gaditana*, *tetraselmis chui* and *chlorella vulgaris*. *Foods*, 10. <https://doi.org/10.3390/foods10123078>
101. Raeisi, M., Huang, J., Franke, M. B., & Zondervan, E. (2023). Valuable bioproducts from microalgae - A superstructure optimization approach. *Algal Research*, 75, 103259. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2023.103259>
102. Ramírez-Flores, S., Guerrero-Barrantes, M., Murillo-Vega, F., & Villalta-Romero, F. (2023). Efectos de la longitud de onda de luz, el fotoperiodo y la salinidad en los parámetros de producción de *Isochrysis galbana*. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/TM.V37I1.6693>
103. Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J., & Chen, F. (2021). Carotenoid Production from Microalgae: Biosynthesis, Salinity Responses and Novel Biotechnologies. *Marine Drugs* 2021, Vol. 19, Page 713, 19(12), 713. <https://doi.org/10.3390/MD19120713>

104. 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). Enhancement of pigments production in the green microalga *Dunaliella salina* (PSBDU05) under optimized culture condition. *Bioresource Technology Reports*, 14, 100672. <https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100672>
105. Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S. A., Lee, K., & Rashid, N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 92, 394–404. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.04.034>
106. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2014.04.007>
107. Sajjadi, B., Chen, W. Y., Raman, A. A. A., & Ibrahim, S. (2018). Microalgae lipid and biomass for biofuel production: A comprehensive review on lipid enhancement strategies and their effects on fatty acid composition. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 97, 200–232. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2018.07.050>

108. San Pedro, A., González-López, C. V., Acien, F. G., & Molina-Grima, E. (2013). Marine microalgae selection and culture conditions optimization for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 134, 353–361. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2013.02.032>
109. Santos Ballardo, D. U., & Rossi, S. (Eds.). (2025). *Microalgae as Promising Source of Commercial Bioproducts* (Vol. 14). Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-86433-9>
110. Sarkar, S., Manna, M. S., Bhowmick, T. K., & Gayen, K. (2020). Extraction of chlorophylls and carotenoids from dry and wet biomass of isolated *Chlorella Thermophila*: Optimization of process parameters and modelling by artificial neural network. *Process Biochemistry*, 96, 58–72. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2020.05.025>
111. Sasso, S., Pohnert, G., Lohr, M., Mittag, M., & Hertweck, C. (2012). Microalgae in the postgenomic era: A blooming reservoir for new natural products. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 761–785. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2011.00304.X>,
112. Schöler, L. M., Gangadhar, K. N., Duarte, P., Placines, C., Molina-Márquez, A. M., León-Bañares, R., Sousa, V. S., Varela, J., & Barreira, L. (2020). Improvement of carotenoid extraction from a recently isolated, robust microalga, *Tetraselmis sp.* CTP4

- (chlorophyta). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43, 785–796. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02273-9>
113. Shi, H., Deng, X., Ji, X., Liu, N., & Cai, H. (2023). Sources, dynamics in vivo, and application of astaxanthin and lutein in laying hens: A review. *Animal Nutrition*, 13, 324–333. <https://doi.org/10.1016/J.ANINU.2023.02.008>
 114. Sirohi, P., Verma, H., Singh, S. K., Singh, V. K., Pandey, J., Khusharia, S., Kumar, D., Kaushalendra, Teotia, P., & Kumar, A. (2022). Microalgal Carotenoids: Therapeutic Application and Latest Approaches to Enhance the Production. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(12), 6257. <https://doi.org/10.3390/CIMB44120427>
 115. Spinola, M. V., & Díaz-Santos, E. (2020). Microalgae nutraceuticals: The role of lutein in human health. *Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products*, 243–263. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0169-2_7/SAVE-RESEARCH
 116. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87–96. <https://doi.org/10.1263/JBB.101.87>
 117. Sportiello, L., Favati, F., Zaroni, M., Cazzaniga, S., Condelli, N., Marchesi, E., & Tolve, R. (2024). Potential of

- microalgae biomass as carotenoids source using natural deep eutectic solvents. *Future Foods*, 10, 100418. <https://doi.org/10.1016/J.FUFO.2024.100418>
118. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., & Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Chroococcales). *BACTEROLOGICAL REVIEWS*, 171–205. <https://journals.asm.org/journal/br>
119. 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>
120. Sun, H., Wang, Y., He, Y., Liu, B., Mou, H., Chen, F., & Yang, S. (2023). Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. *Marine Drugs*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/MD21020082>
121. Sun, X. M., Geng, L. J., Ren, L. J., Ji, X. J., Hao, N., Chen, K. Q., & Huang, H. (2018). Influence of oxygen on the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in microalgae. *Bioresource Technology*, 250, 868–876. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.11.005>

122. Sun, X. M., Ren, L. J., Zhao, Q. Y., Ji, X. J., & Huang, H. (2018). Microalgae for the production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and adaptation. *Biotechnology for Biofuels* 2018 11:1, 11(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13068-018-1275-9>
123. Takaichi, S. (2011). Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Marine Drugs* 2011, Vol. 9, Pages 1101-1118, 9(6), 1101–1118. <https://doi.org/10.3390/MD9061101>
124. Varela, J. C., Pereira, H., Vila, M., & León, R. (2015). Production of carotenoids by microalgae: Achievements and challenges. *Photosynthesis Research*, 125(3), 423–436. <https://doi.org/10.1007/S11120-015-0149-2>,
125. Wan Mahari, W. A., Wan Razali, W. A., Leong, Y. K., Sharma, V., Tambat, V. S., Pathak, H. K., Ma, N. L., Phang, S. M., Dong, C. Di, & Lam, S. S. (2025). Microalgae as a sustainable source of carotenoids: Strategies to improve yield and productivity. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(3), 116848. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2025.116848>
126. Wang, C. A., Onyeaka, H., Miri, T., & Soltani, F. (2024). *Chlorella vulgaris* as a food substitute: Applications and benefits in the food industry. *Journal of Food Science*, 89(12), 8231. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17529>

127. Wang, J., Hu, X., Chen, J., Wang, T., Huang, X., & Chen, G. (2022). The Extraction of β -Carotene from Microalgae for Testing Their Health Benefits. *Foods*, 11(4), 502. <https://doi.org/10.3390/FOODS11040502>
128. Wong, E. (2010). ¿Después de un análisis de variancia...qué? Ejemplos en ciencia de alimentos. *Agronomía Mesoamericana*. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212010000200016
129. Yağcılar, Ç. Y. (2022). *The microalgae Chlorella: A highly beneficial microorganism. 7º CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS MODERNAS DE ASIA PACÍFICO*. Iksad Publications. https://www.researchgate.net/publication/365823801_7th_ASIA_PACIFIC_INTERNATIONAL_MODERN_SCIENCES_CONGRESS
130. Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A., & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117(4), 257–264. <https://doi.org/10.1007/S10265-004-0154-6>
131. Yamamoto, M., Kurihara, I., & Kawano, S. (2005). Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae,

- Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta*, 221(6), 766–775. <https://doi.org/10.1007/S00425-005-1486-8>
132. Ye, Z. W., Jiang, J. G., & Wu, G. H. (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>
133. Zavafer, A., & Mancilla, C. (2021). Concepts of photochemical damage of Photosystem II and the role of excessive excitation. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 47, 100421. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOCHEMREV.2021.100421>

Anexo 1

Inoculación y escalamiento de cultivos de 1000 mL

**Anexo 2**

Sujetos experimentales y Diseño en Bloques

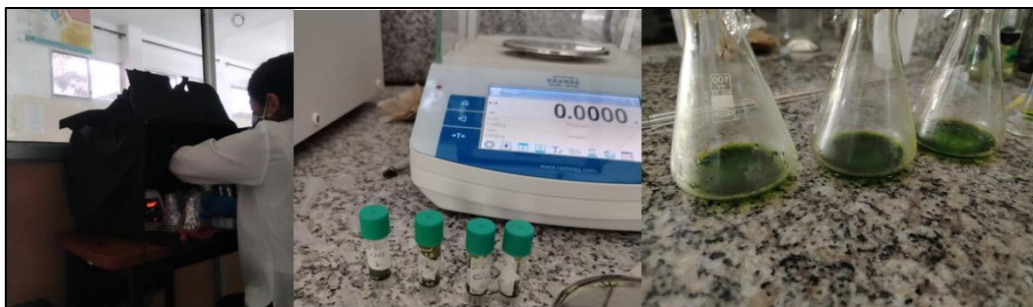
**Anexo 3**

Cosecha de biomasa microalgal.



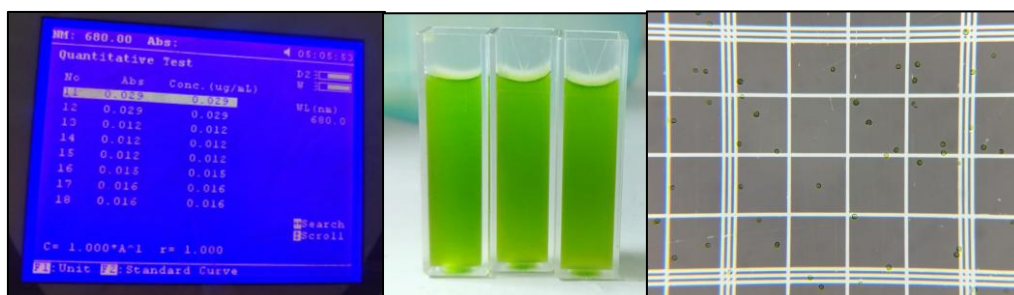
Anexo 4

Extracción de carotenos totales en C. vulgaris



Anexo 5.

Conteo celular y densidad óptica



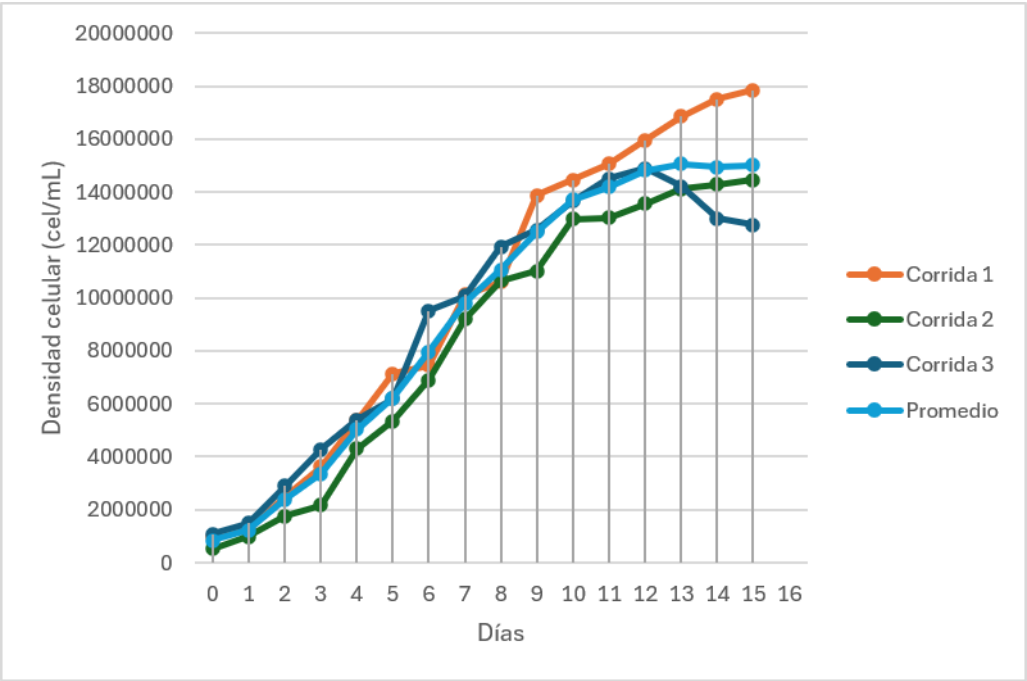
Anexo 6

Promedio de conteos celulares y densidades ópticas de tres corridas experimentales

Días	Densidad optica (µg/mL)	Densidad celular (x10 ⁵)
0	0,148	946111
1	0,067	1231597
2	0,138	2377083
3	0,229	3355208
4	0,360	5018750
5	0,451	6219271
6	0,568	7956250
7	0,680	9796292
8	0,774	11069792
9	0,921	12486979
10	1,002	13698611
11	1,077	14190833
12	1,158	14806979
13	1,194	15056458
14	1,174	14931458
15	1,152	15019965

Anexo 7.

Curva de crecimiento de tres corridas experimentales



Anexo 8.

Promedio de pigmentos carotenos por duplicado de los ciclos de producción

	BLOQUES	TRATAMIENTOS	mg/g carotenos totales	Promedio
Corrida 1	BLOQUE 1	TC	10,42	9,13
		TC	7,84	
		T1	13,44	14,605
		T1	15,77	
		T2	8,65	8,845
		T2	9,04	
		T3	6,3	7,415
		T3	8,53	
Corrida 2	BLOQUE 2	TC	7,96	7,525
		TC	7,09	
		T1	13,53	12,02
		T1	10,51	
		T2	5,23	5,66
		T2	6,09	
		T3	5,45	4,97
		T3	4,49	

Corrida 3	BLOQUE 3	TC	6,82	7,79
		TC	8,76	
		T1	12,89	13,085
		T1	13,28	
		T2	9,63	8,075
		T2	6,52	
		T3	7,56	9,065
		T3	10,57	

Anexo 9.

Datos de carotenos totales, clorofila a y b

	Cl a	Cl b	Carotenos totales	Promedio ct	Biomasa total seca (mg)	Total % Carotenos totales
Tc	58,8427119	44,880678	6,82	8,21	1,64	13,4644
	53,0267797	31,1345763	8,76			
	35,0811957	24,6988758	7,96			
	25,4135411	13,2084313	7,09			
	47,6629213	30,5423902	10,42			
T1	70,9430011	46,3183651	12,89	13,08167	3,3	43,1695
	68,6148936	43,9275476	13,28			
	28,3358712	20,1154318	10,51			
	54,3446091	41,5877363	12,6			
	51,6807967	26,860572	13,44			
	63,2265066	32,8613381	15,77			
T2	14,1171333	9,36147816	9,63	7,511667	4,26	31,9997
	21,7408735	8,93079507	6,43			
	17,6334185	11,8588656	5,23			
	20,1018396	7,75365355	6,09			
	31,3501532	18,1403473	8,65			
	29,4386108	14,8388151	9,04			
T3	35,118477	24,325196	7,89	7,206667	6,57	47,3478
	40,3558791	26,0351624	10,57			
	27,3801226	20,6963209	5,46			
	27,1944813	21,6774655	4,49			
	28,325332	20,7226762	6,3			
	30,6903984	17,7974464	8,53			

Anexo 10.

Matriz para cálculo de carotenos totales, clorofila a y clorofila b

		Clorofila a																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															</
--	--	-------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	----