



UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *CHLORELLA SPP.*

ESTRESADA AISLADA DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título:

BIÓLOGO

AUTOR:

YUGCHA LAPO SANTIAGO DAVID

TUTORA:

Blga. Dennis Tomalá Solano, MSc.

COTUTORA:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph. D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2025

UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

CARRERA DE BIOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *CHLORELLA SPP.*

ESTRESADA AISLADA DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Previa a la obtención del título:

BIÓLOGO

AUTOR:

YUGCHA LAPO SANTIAGO DAVID

TUTORA:

Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc.

COTUTORA:

Blga. Janeth Galarza Tipán, Ph. D.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2025

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, **“Evaluación de la capacidad antioxidante de *Chorella spp.* estresada aislada de la península de Santa Elena”**, elaborado por Yugcha Lapo Santiago David, 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 dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos. Razón por la cual, apruebo en todas sus partes encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

La Libertad, 13 de junio de 2025

Atentamente

A handwritten signature in blue ink, reading "Dennis Tomalá Solano", written over a horizontal line.

Blga. Dennis Tomalá Solano, M.Sc.

DOCENTE TUTOR

C.I. 0922584982

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Chlorella spp.* ESTRESADA AISLADA DE LA PENINSULA DE SANTA ELENA**”, elaborado por **YUGCHA LAPO SANTIAGO DAVID**, 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. Erika Salavarría Palma, PhD.

DOCENTE DE AREA

C.I. 0912260387

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada paso de esta etapa académica. Gracias por darme la sabiduría para enfrentar los retos, la paciencia para no rendirme y la fe necesaria para seguir adelante incluso en los momentos de mayor dificultad.

A mi madre, Janeth Lapo, por su amor inmenso, su esfuerzo incansable y por ser siempre mi ejemplo de valentía y perseverancia. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por cada sacrificio silencioso y por enseñarme a nunca detenerme ante la adversidad.

A mis hermanos, Génesis Yugcha, Adrián Yugcha y Christian Yugcha, por ser parte esencial de mi vida. Su compañía, sus palabras de ánimo y su cariño incondicional han sido un soporte constante que me motivó a seguir adelante. Gracias por estar presentes en este proceso, celebrando mis logros y levantándome en los momentos difíciles.

A mi abuelita Mariela Celi, quien, aunque ya no está físicamente conmigo, ha dejado una huella imborrable en mi vida. Su amor, su ternura y sus enseñanzas siguen acompañándome como una luz que me guía desde lo alto.

A todos ustedes, gracias por acompañarme en este viaje. Este triunfo también es suyo.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Estatal Península de Santa Elena, a sus autoridades y docentes de la Facultad de Ciencias del Mar, por brindarme la formación académica y las herramientas necesarias para crecer como profesional.

A la Blga. Janeth Galarza, PhD., por su valiosa guía durante este proceso investigativo, por su paciencia, por cada observación compartida y por confiar en mis capacidades a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A la Blga. Dennis Tomalá, mi tutora de tesis, por su constante apoyo, orientación técnica y acompañamiento comprometido, cuyas sugerencias y consejos fortalecieron cada etapa de esta investigación. A la Blga. Sara Ríos, por su guía práctica en el laboratorio, por compartir sus conocimientos y ayudarme a comprender mejor cada fase del trabajo experimental. A la Ing. María Fernanda Quinteros, por su colaboración y valioso apoyo en la realización de mis análisis en la provincia de Guaranda, lo cual fue clave para completar los objetivos propuestos.

A mis amigos de la universidad, quienes hicieron que este camino no solo fuera formativo, sino también lleno de memorias inolvidables. A Luis Machuca, Alexander Vergara, Gabriela Ortega, Samantha Cañar, Rebeca Cevallos y Marcos Vega, gracias por las risas compartidas, las madrugadas de estudio, el apoyo mutuo y la amistad sincera. Cada uno ha sido parte fundamental de este logro.

A todos ustedes, gracias por ser parte esencial de este logro académico.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **YUGCHA LAPO SANTIAGO DAVID** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 7 de julio de 2025



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



Blga. Erika Salavarría Palma, PhD.
**PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



Blga. Dennis Tomalá Solano, MSc.
**DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



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



Lcdo. Pascual Roca Silvestre, MSc.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

El compromiso y responsabilidad por los datos, análisis y resultados emitidos en este Trabajo de Integración Curricular me pertenecen exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE).



YUGCHA LAPO SANTIAGO DAVID

C.I. 1105078305

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	9
4. OBJETIVOS.....	12
4.1. Objetivo general	12
4.2. Objetivos específicos.....	12
5. HIPÓTESIS	13
5.1. Nula	13
6. MARCO TEÓRICO	14
6.1. Género Chlorella	14
6.2. Fases de crecimiento.....	15
6.2.1. Fase de adaptación.....	15
6.2.2. Fase de aceleración.....	16
6.2.3. Fase exponencial	16
6.2.4. Fase de desaceleración	16
6.2.5. Fase estacionaria.....	17
6.2.6. Fase de muerte.....	17
6.3. Condiciones de cultivo generales	17

6.3.1. Luz.....	17
6.3.2. Aireación	18
6.3.3. pH.....	18
6.3.4. Temperatura.....	18
6.4. Medios de cultivo	19
6.4.1. Medio Bold Basal.....	19
6.4.2. Medio BG11	19
6.4.3. Medio Guillard F/2.....	20
6.4.4. Medio Fogg's Nitrogen-Free.....	20
6.4.5. Medio Johnson	21
6.4.6. Nitrogen-Phosphorus-Potassium (N.P.K.)	21
6.5. Composición Bioquímica.....	22
6.6. Estrés Lumínico en <i>Chlorella</i>	22
6.7. Cuantificación espectrofotométrica	23
6.7.1. Curvas de calibración	24
6.8. Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).....	25
6.9. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))	26
6.10. Método FRAP (Poder Reductor Férrico)	26
7. MARCO METODOLÓGICO	27

7.1. Área de estudio.....	27
7.2. Obtención de muestras biológicas.....	27
7.2.1. Mantenimiento de la microalga <i>Chlorella</i> spp.	29
7.3. Curva de crecimiento.....	31
7.4. Estrés de la microalga <i>Chlorella</i> spp.....	33
7.5. Obtención de biomasa.....	34
7.6. Extracción de carotenos.....	35
7.6.1. Determinación espectrofotométrica de pigmentos.....	37
7.7. Preparación de muestras.....	38
7.8. Curva de calibración de trolox para el ensayo DPPH.....	40
7.8.1. Preparación de soluciones de trabajo.....	40
7.8.2. Procedimiento experimental.....	42
7.8.3. Análisis de datos.....	43
7.9. Evaluación de la actividad antioxidante con ensayo DPPH.....	44
7.9.1. Cuantificación de la actividad antioxidante.....	44
7.9.2. Cálculo de la concentración antioxidante.....	45
7.10. Análisis estadístico.....	46
8. RESULTADOS.....	47
8.1. Cinética de crecimiento.....	47
8.1.1. Dinámica de crecimiento celular bajo condiciones controladas.....	47

8.1.2. Tasa de crecimiento y productividad celular.....	48
8.2. Producción de carotenos bajo estrés lumínico.....	49
8.2.1. Concentración de carotenos bajo diferentes condiciones de luz	49
8.2.2. Análisis estadístico del efecto del estrés	50
8.3. Capacidad antioxidante	51
8.3.1. Capacidad antioxidante según el primer extracto E1	51
8.3.2. Capacidad antioxidante según el segundo extracto E2.....	53
8.3.3. Relación entre carotenos y capacidad antioxidante.....	54
9. DISCUSIONES.....	56
10. CONCLUSIONES.....	60
11. RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS.....	63
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>Chlorella spp.</i> a 100x.....	14
Figura 2. Diseño experimental	28
Figura 3. Mantenimiento de <i>Chlorella spp.</i>	30
Figura 4. Conteo en cámara de Neubauer	31

Figura 5. Metodo de obtención de biomasa	34
Figura 6. Metodología de extracción de carotenos utilizada para <i>Chlorella spp.</i>	36
Figura 7. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> en condiciones controladas.....	47
Figura 8. Concentración de carotenos bajo estrés lumínico.....	51
Figura 9. Capacidad antioxidante obtenida mediante el primer extracto	52
Figura 10. Capacidad antioxidante obtenida mediante el segundo extracto	54
Figura 11. Correlación de Spearman entre carotenos contra el primer y segundo extracto.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productividad celular y tasa de crecimiento de <i>Chlorella spp.</i> en condiciones controladas.....	49
Tabla 2. Contenido de clorofilas y carotenos totales.....	50
Tabla 3. Contenido de carotenos y evaluación antioxidante con ambos extractos.....	53

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Conteo en cámara de Neubauer	73
Anexo 2. Extracción de carotenos protegiendo los pigmentos.....	73
Anexo 3. Lectura de carotenos	74
Anexo 4. Materiales para la evaluación antioxidante.....	74
Anexo 5. Preparación de muestra para la lectura	75
Anexo 6. Reactivo DPPH con el extracto de <i>Chlorella spp.</i>	75
Anexo 7. Colocación de muestra en espectrofotómetro Nanodrop	76
Anexo 8. Lectura en Nanodrop	76
Anexo 9. Datos del conteo celular en el medio de cultivo NPK.....	77
Anexo 10. Absorbancias obtenidas durante la extracción de carotenos.....	77
Anexo 11. Valores de clorofilas totales y carotenos, por muestra.....	78
Anexo 12. Registro de valores para realizar la curva de calibración.....	78
Anexo 13. Curva de calibración para la capacidad antioxidante.....	79
Anexo 14. Capacidad antioxidante del primer extracto	79
Anexo 15. Capacidad antioxidante del segundo extracto.....	80
Anexo 16. Análisis estadístico Shapiro-Wilk.....	80
Anexo 17. Análisis estadístico Kruskal-Wallis para carotenos	80
Anexo 18. Análisis estadístico Kruskal-Wallis para el primer extracto	81
Anexo 19. Análisis estadístico Kruskal-Wallis para el segundo extracto	81
Anexo 20. Correlación de Spearman entre carotenos y el primer extracto	81

Anexo 21. Correlacion de Spearman entre carotenos y el segundo extracto.....	81
Anexo 22. Informe de la capacidad antioxidante de <i>Chlorella spp.</i> realizado en la UEB.	92

SIMBOLOGÍA Y ABREVIATURAS

Símbolo	Significado
MV	Muestra vegetativa
M10D	Muestra estresada 10 días
M20D	Muestra estresada 20 días
μ	Tasa de crecimiento
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
E1	Primer método de extracción
E2	Segundo método de extracción
μmol	Micromol
mL	Mililitro
L	Litro
Cel	Célula(s)
g	Gramos
mg	Miligramos
Eq trolox	Equivalente trolox
μg/mg	Microgramos por miligramos

Cel/ml	Células por mililitros
d⁻¹	Días
μmol/ m²/ s¹	Micromol por metro cuadrado por segundo
g*ml⁻¹	Gramos por mililitro

RESUMEN

Chlorella spp., es una microalga verde con alta capacidad adaptativa, que ha destacado como una fuente de compuestos bioactivos como los carotenos, se ha consolidado como una fuente prometedora de antioxidantes naturales. Estos metabolitos tienen especial relevancia frente al estrés oxidativo, un proceso relacionado con la acumulación de especies reactivas al oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa celular. En Ecuador, y particularmente en la península de Santa Elena, su potencial bioactivo aún no ha sido caracterizado bajo condiciones de estrés lumínico. Este estudio evaluó la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.* estresada, cultivada en medio NPK. Donde se determinó la cinética de crecimiento bajo condiciones controladas, alcanzando una tasa específica de $0,773 \text{ d}^{-1}$. Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a irradiancia de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 10 y 20 días sin aporte nutricional. Se cuantificaron carotenos mediante espectrofotometría UV-Vis y la actividad antioxidante con el método DPPH, utilizando dos extractos (E1 y E2), expresando los resultados en $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$. Los niveles más altos de carotenos se observaron en la muestra control ($2.15 \pm 0,26 \mu\text{g/mg}$), disminuyendo significativamente bajo estrés prolongado. Sin embargo, la actividad antioxidante fue mayor en la muestra expuesta a 10 días de estrés ($23,20 \pm 1,17$ en E1 y $85,23 \pm 2,70$ en E2), indicando que un estrés moderado estimuló la síntesis de compuestos bioactivos. No se halló correlación significativa entre concentración de carotenos y capacidad antioxidante ($\rho < 0,6$; $p > 0,05$), lo que sugiere la participación de otros metabolitos. Se concluye que *Chlorella spp.* aislada localmente posee un alto potencial como fuente de antioxidantes naturales, y representa una alternativa viable para el desarrollo de productos funcionales en sectores farmacéutico, alimentario y cosmético.

Palabras clave: *Chlorella spp.*, carotenos, estrés lumínico, antioxidantes, DPPH, trolox, microalgas.

ABSTRACT

Chlorella spp. is a green microalga with high adaptive capacity, recognized as a source of bioactive compounds such as carotenoids, and has emerged as a promising source of natural antioxidants. These metabolites are particularly relevant in counteracting oxidative stress; a process associated with the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the cellular defense mechanisms. However, its antioxidant potential under light stress conditions remains understudied in Ecuador, particularly in the Santa Elena Peninsula. This research evaluated the antioxidant capacity of *Chlorella spp.* under light and nutrient stress, using the DPPH assay. The microalga was cultured in NPK medium, achieving a specific growth rate (μ) of 0.773 d^{-1} . Cultures were then exposed to high irradiance ($140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) for 10 and 20 days without nutrient supplementation. Carotenoids were quantified by UV-Vis spectrophotometry, and antioxidant activity was assessed using two extraction methods (E1 and E2), expressed as Trolox equivalents (TEAC). The highest carotenoid content was recorded in the control sample ($2.15 \pm 0.06 \mu\text{g/mg}$), with a significant decrease under prolonged stress. In contrast, antioxidant activity peaked in the sample stressed for 10 days (23.20 ± 1.17 in E1; 85.23 ± 2.70 in E2), indicating that moderate stress stimulates the production of antioxidant metabolites. No significant correlation was found between carotenoid content and antioxidant activity ($\rho < 0.6$; $p > 0.05$), suggesting other compounds may contribute to the observed bioactivity. The results highlight the biotechnological potential of locally isolated *Chlorella spp.* as a source of natural antioxidants, with promising applications in pharmaceutical, nutraceutical, and cosmetic industries.

Key words: *Chlorella spp.*, carotenoids, light stress, antioxidants, DPPH, trolox, microalgae.

1. INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo es un fenómeno que ocurre cuando el organismo no logra eliminar de manera correcta los radicales libres, que son moléculas altamente reactivas generadas durante procesos metabólicos normales o como respuesta a estímulos externos (Ajitha et al., 2021). Al acumularse estos radicales dañan estructuras celulares como proteínas, lípidos y ADN, que contribuyen al desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Nascimento et al., 2019; Ajitha et al., 2021).

Gauthier et al. (2020) mencionan que el estrés oxidativo tiene un impacto negativo sobre la salud celular, lo cual ha generado un creciente interés en la búsqueda de soluciones efectivas para mitigar sus efectos dañinos. En este contexto, los antioxidantes naturales, como los carotenos, han captado la atención de la comunidad científica. Estos compuestos son reconocidos por su capacidad para neutralizar radicales libres e inhibir el daño oxidativo, contribuyendo así a la protección celular (Coulombier et al., 2021; Cichoński & Chrzanowski, 2022).

Los carotenos son compuestos lipofílicos que se encuentran en frutas, verduras y microalgas, se destacan por la eficacia en la neutralización de radicales libres (Nascimento et al., 2019). Dentro de estas fuentes se encuentra *Chlorella spp.* una microalga unicelular

de color verde que pertenece a las Chlorophytas, esta ha destacado por su alto contenido en carotenos, siendo estudiada por sus propiedades nutricionales (Ali et al., 2020; Pradhan et al., 2020; Félix-Castro et al., 2024).

Reyes et al. (2023) y Guillen (2019), mencionan que en Ecuador las investigaciones sobre las propiedades de *Chlorella* son limitadas, a pesar de que la biodiversidad de microalgas presenta un alto potencial biotecnológico, señalando la importancia en estudios locales.

Por las condiciones ambientales, la península de Santa Elena constituye una localidad idónea para el cultivo de microalgas (Guillen, 2019; Reyes et al., 2023). Sin embargo, no se han realizado estudios que exploren la concentración de carotenos en cepas de *Chlorella* que se encuentran en la región, tampoco se ha evaluado su capacidad para combatir el estrés oxidativo (Sadek et al., 2025; Felix-Castro et al., 2024). Su falta de investigación limita el aprovechamiento de la cepa como una fuente de carotenos.

En este estudio se propone analizar la producción de carotenos en *Chlorella spp.* aislada de la península de Santa Elena, utilizando métodos analíticos que permiten cuantificar estos compuestos y medir la capacidad antioxidante de la cepa. Bulut et al. (2024) y Vignaud et al. (2023) destacan la importancia de analizar las propiedades antioxidantes de la cepa, para evaluar su viabilidad en aplicaciones industriales y de salud.

Los resultados obtenidos contribuirán al desarrollo científico sobre *Chlorella spp.*, además podrían impulsar el desarrollo de productos farmacéuticos, alimenticios o cosméticos, que busquen propiedades antioxidantes en dichos productos (Gauthier et al., 2020; Vignaud et al., 2023).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Ecuador, existen pocos estudios sobre compuestos antioxidantes obtenidos de microalgas, sobre todo en especies como *Chlorella spp.* Aunque en diversos países ya se han demostrado que las microalgas contienen antioxidantes, como los carotenos y los compuestos fenólicos y en Ecuador la investigación en dicho campo no ha tenido mucho desarrollo (Abdelkarim et al., 2019). Dicha situación se nota en la provincia de Santa Elena, donde las condiciones ambientales son idóneas para el cultivo de microalgas, sin embargo, no hay proyectos que apoyen las investigaciones de estas microalgas.

En los últimos años, ha crecido el interés por los antioxidantes naturales en áreas como la alimentación, la cosmética y la medicina. Esto ha motivado nuevas investigaciones que resaltan la importancia de los carotenos y otras sustancias producidas por las microalgas (Li et al., 2006; Choochote et al., 2014). A pesar de esto, en la península de Santa Elena todavía no se han hecho investigaciones que analicen la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.* cultivada en estas condiciones locales, ni se sabe con claridad cómo afecta el estrés lumínico a la producción de carotenos. Esta falta de información dificulta el desarrollo de tecnología nacional para la producción de antioxidantes naturales, y también frena la posibilidad de generar productos innovadores y aprovechar mejor los recursos naturales.

Otros países han desarrollado este campo, con tecnologías como la extracción subcrítica para obtener compuestos fenólicos de *Chlorella*, lo que permite el aprovechamiento de sus propiedades antioxidantes de forma eficiente (Zakaria et al., 2017). Por otro lado, Ecuador sigue dependiendo de la importación de antioxidantes comerciales sin aprovechar su potencial biotecnológico. La falta de estudios sobre *Chlorella spp.* es un problema para la generación de conocimiento científico, desarrollo económico y mejora de la salud pública, ya que los antioxidantes son importantes para prevenir de enfermedades crónicas relacionadas con el estrés oxidativo (Yu et al., 2019).

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de la biomasa de *Chlorella*, así como su digestión, puede afectar bastante la forma en que se liberan los compuestos antioxidantes. Esto resalta lo importante que es contar con tecnologías adecuadas para su cultivo, sobre todo cuando se trata de adaptarlas a las condiciones locales (Paterson et al., 2024; Goiris et al., 2012). De manera similar, Manivannan et al. (2012) también encontraron que ciertas microalgas marinas, como *Chlorella marina*, tienen una buena capacidad antioxidante, lo que hace aún más interesante el estudio de cepas que se adapten bien a distintos ambientes.

Frente a dicha problemática, es importante impulsar la investigación de la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.*, con el fin de fijar su potencial como fuente de compuestos bioactivos de valor. Esto permitiría promover el desarrollo de productos

innovadores, variar la economía local y mejorar la salud pública mediante el uso de antioxidantes naturales. Para lograrlo, es necesario incentivar la inversión en infraestructura, programas de investigación y promover colaboraciones del sector productivo privado, de manera que Ecuador se coloque como referente en la producción de biocompuestos provenientes de microalgas.

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de *Chlorella spp.* es una gran oportunidad para el avance en la ciencia y biotecnología en Ecuador, como fuente de antioxidantes naturales. Los carotenos antioxidantes que se encuentran en *Chlorella spp.* ayudan a protegerse del daño oxidativo causado por los radicales libres. Daño que se relaciona con enfermedades crónicas como el cáncer, diabetes y problemas neurológicos (López et al., 2020). En el estudio de Wang et al. (2024), mencionan el aumento de los beneficios de *Chlorella* como suplemento alimentario. En Ecuador no se registra suficientes estudios las variedades de la misma, esto permite el aprovechamiento de estas microalgas como una fuente antioxidante. La limitada investigación retrasa el desarrollo de productos nuevos para las diferentes industrias que podrían aprovecharlo.

Aunque cada vez hay más pruebas que muestran los beneficios de usar *Chlorella* como suplemento alimenticio (Wang et al., 2024), en el país todavía no se han hecho suficientes estudios sobre las variedades locales. Esto hace que no se pueda aprovechar todo el potencial que estas microalgas tienen como fuente de compuestos saludables. La falta de investigación limita el conocimiento y retrasa el desarrollo de productos nuevos para las industrias de alimentos, cosméticos y salud.

Cultivar *Chlorella spp.* tiene varias ventajas, es una microalga fácil de manejar, que crece rápido y no necesita tantos recursos como otros cultivos más comunes, especialmente si se dan manejan condiciones, como ocurre en la península de Santa Elena (Ferdous et al., 2022). Esta región tiene un clima ideal para su cultivo, pero aún no se han hecho suficientes estudios que analicen cómo la exposición a luz intensa puede afectar la cantidad de antioxidantes que produce. La *Chlorella* es rica en carotenos, compuestos que se usan en productos de salud, belleza y alimentación (Agustina et al., 2021). A pesar de eso, en el país todavía no hay información clara que permita desarrollar formas efectivas de producción y aprovechamiento de estos compuestos.

Realizar estudios sobre *Chlorella spp.* cultivada en la península de Santa Elena ayudará a llenar los vacíos que existen sobre su capacidad para combatir el estrés oxidativo, un proceso que está detrás de muchas enfermedades (El-Fayoumy et al., 2021). Además, investigaciones como la de Mtaki et al. (2020) han mostrado que cultivar *Chlorella* en medios económicos y bajo condiciones de estrés puede aumentar su poder antioxidante. Esto indica que sería muy útil aplicar estas técnicas en Ecuador para mejorar la calidad de la microalga. Conocer bien los antioxidantes que produce la *Chlorella* local podría ser un paso clave para desarrollar productos naturales que reemplacen a los antioxidantes artificiales, lo cual no solo es mejor para la salud de las personas, sino que también ayuda a cuidar el medio ambiente.

Este tipo de investigaciones también puede abrir nuevas oportunidades en el área de la biotecnología y ayudar al desarrollo de la industria local, aportando a una economía más diversa en la península de Santa Elena. Algunos estudios, como los de Abdelkarim et al. (2019); Li et al. (2006), & Goiris et al. (2012), han demostrado que *Chlorella* es una buena fuente de antioxidantes con alto valor. Por eso, es importante que se desarrollen este tipo de investigaciones, generando conocimiento propio que permita innovar, mejorar la salud de las personas y aprovechar los recursos naturales de forma responsable y sostenible.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Evaluar la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.* estresada mediante el análisis de DPPH, destacando las propiedades en la mitigación del estrés oxidativo.

4.2. Objetivos específicos

- Establecer la cinética de crecimiento de *Chlorella spp.* bajo condiciones controladas, estableciendo parámetros óptimos en su desarrollo.
- Evaluar el efecto del estrés lumínico en la producción de carotenos en *Chlorella spp.* empleando métodos analíticos para la cuantificación de carotenos.
- Analizar la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.* estresada y su relación frente a un antioxidante de referencia comercial.

5. HIPÓTESIS

5.1. Nula

- No existe una relación significativa entre la concentración de carotenos y la capacidad antioxidante en *Chlorella spp.* bajo condiciones de estrés lumínico y nutritivo.

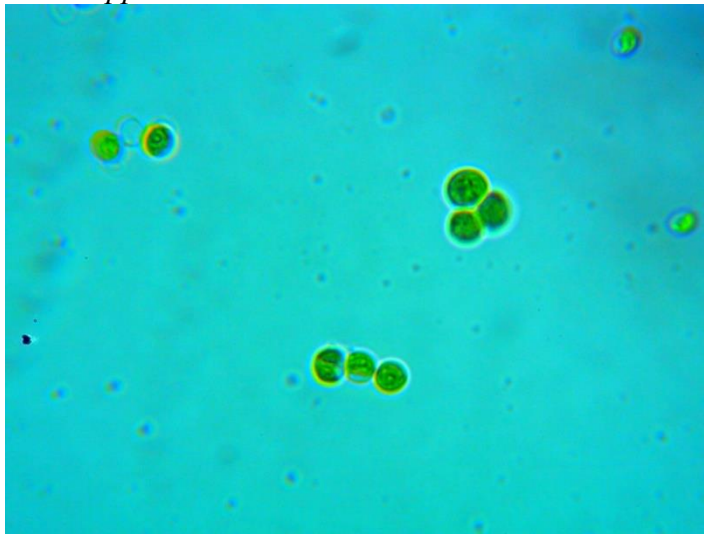
6. MARCO TEÓRICO

6.1. Género *Chlorella*

Chlorella es un género de microalgas verdes unicelulares (Chlorophytas) con registro fósil desde el Precámbrico, lo que evidencia la resistencia evolutiva de esta (Moreno, 2019). Tiene una morfología esférica y tamaño de 2 y 10 μm que están definidos por una pared celular rígida que protege sus orgánulos como se observa en la figura 1 (Safi et al., 2014).

Figura 1.

Células de Chlorella spp. a 100x.



Nota: Colonias de *Chlorella*

Esta microalga se caracteriza por su tasa de crecimiento alta y la facilidad de adaptación, lo que favorece su cultivo en condiciones controladas (Moreno, 2019). Además, como menciona Borowitzka (2018) presentan bajos costos de producción y una elevada eficiencia en la producción de biomasa. *Chlorella* es una de las microalgas más conocidas e investigadas actualmente, por el potencial biotecnológico en alimentación, energía y salud (Borowitzka, 2018).

Chlorella no tiene capacidad de movimiento y se reproduce rápidamente de manera asexual, mediante un proceso llamado auto esporulación (Safi et al., 2014; Borowitzka, 2018). En aproximadamente 24 horas, una célula madre se divide en cuatro células hijas (Borowitzka, 2018). Estas nuevas células se desarrollan dentro de la pared celular de la célula madre, y cuando están completamente formadas, la pared de la célula madre se rompe, liberando las células hijas, que posteriormente consumen los restos de la célula madre para crecer (Safi et al., 2014).

6.2. Fases de crecimiento de microalgas

6.2.1. Fase de adaptación

Corresponde al periodo en el cual las células ajustan su metabolismo a nuevas condiciones ambientales como temperatura, pH y luz, generando un retraso en el crecimiento celular (Arredondo et al., 2017; Zhou et al., 2023). Durante esta etapa, no hay

división celular activa, pero se sintetizan proteínas y enzimas necesarias para el crecimiento (Zhou et al., 2023).

6.2.2. Fase de aceleración

El cultivo crece más rápido, Arredondo et al. (2017) menciona que es el paso a la fase exponencial, ya que la célula comienza a formar proteínas y activar la síntesis de ARNm.

6.2.3. Fase exponencial

Implica una rápida y constante división celular, gracias a la ausencia de factores limitantes y la disponibilidad óptima de nutrientes (Arredondo et al., 2017). La tasa de duplicación es máxima y estable en esta etapa.

6.2.4. Fase de desaceleración

La tasa de crecimiento disminuye por agotamiento de nutrientes y acumulación de metabolitos, mientras la concentración celular alcanza su máximo (Arredondo et al., 2017); García-García et al., 2015). Además, se observan cambios bioquímicos contrarios a los que existen durante la fase exponencial (García-García et al., 2015).

6.2.5. Fase estacionaria

Ocurre cuando la natalidad se equilibra con la mortalidad, donde existe un crecimiento neto igual a cero por condiciones limitantes como baja disponibilidad de luz, nutrientes y oxígeno (Arredondo et al., 2017; Abdillah et al., 2020). En esta fase pueden acumularse metabolitos secundarios (Abdillah et al., 2020).

6.2.6. Fase de muerte

La tasa de mortalidad supera la natalidad, donde se reduce la concentración celular por el agotamiento de recursos y estrés ambiental acumulado (Arredondo et al., 2017; García-García et al., 2015). Esta etapa implica la pérdida progresiva de biomasa viable (García-García et al., 2015).

6.3. Condiciones de cultivo generales

6.3.1. Luz

Masojídek & Torzillo (2008) mencionan que los organismos fotosintéticos dependen de factores como la densidad celular, distancia óptica, densidad de flujo de fotones, etc.

Para el crecimiento de *Chlorella* el rango óptimo para su crecimiento es de 32 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ a 40 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$, además de poseer un fotoperiodo de 12 horas (Aly et al., 2024; Sarker & Salam, 2019).

6.3.2. Aireación

La aireación consiste en suministrar CO_2 al medio de cultivo, siendo este necesario para realizar los procesos fotosintéticos en microalgas, también evitar el oxígeno acumulado en el medio (Molina et al., 2010; Céspedes, 2016)

6.3.3. pH

Jui et al. (2024) mencionan que en cepas de *Chlorella vulgaris* el pH óptimo debe estar en el rango de 7 a 7.5, para el crecimiento de la microalga.

6.3.4. Temperatura

Dependiendo de la cepa la temperatura varía entre 20°C a 26°. Según Arredondo et al. (2017) cuando se planea cultivar durante periodos largos, su temperatura debe ser de 15°C a 21°C aproximadamente.

6.4. Medios de cultivo

Wong y Chung (2017) mencionan que las microalgas del género *Chlorella* se cultivan en una variedad de medios de cultivo, como Bold Basal, BG-11, F/2, Fogg's Nitrogen Free, NPK, Johnson y Chu's No. 10, los cuales varían en su composición de nutrientes dependiendo de la composición bioquímica deseada en el cultivo.

6.4.1. Medio Bold Basal

Se utiliza generalmente para cultivar microalgas verdes de agua dulce, como el género *Chlorella* (Mishra et al., 2021). Mishra et al. (2021) mencionan que este medio lleva nitrato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de magnesio y una mezcla de oligoelementos esenciales, lo que permite que las microalgas crezcan bien en condiciones sin contaminación. Aun así, tiene ciertas limitaciones, ya que cuando se somete a algunas condiciones, no favorece mucho la producción de pigmentos.

6.4.2. Medio BG11

Originalmente desarrollado para cianobacterias, demostrando ser efectivo para especies del género *Chlorella* (CPCC, 2023). Contiene nitrato de sodio, fosfato de potasio, citrato férrico y una mezcla de micronutrientes (Matos et al., 2022). Este medio ha reportado que promueve un alto contenido proteico, aunque su eficiencia

en la acumulación de carotenos se ha visto limitada comparándolo con otros medios (CPCC, 2023; Matos et al., 2022).

6.4.3. Medio Guillard F/2

Este medio se diseñó para microalgas marinas, pero también se ha adaptado a cepas de agua dulce como especies del género *Chlorella* (Gupta et al., 2020). Incluye nitratos, fosfatos y una solución de vitaminas (CPCC, 2023). Se ha destacado su utilidad en condiciones de estrés por nitrógeno, que se destaca por la acumulación de lípidos y carbohidratos, compuestos importantes para estudios relacionados a los biocombustibles (Gupta et al., 2020; CPCC, 2023).

6.4.4. Medio Fogg's Nitrogen-Free

Esta formulado sin fuente de nitrógeno, la cual permite evaluar la fijación biológica del nitrógeno o inclusive inducir la producción de metabolitos secundarios (Mishra et al., 2021; Matos et al., 2022). Las microalgas pueden alterar su metabolismo para aumentar la producción de lípidos y antioxidantes, sin embargo, su crecimiento puede verse limitado (Mishra et al., 2021; Matos et al., 2022).

6.4.5. Medio Johnson

Diseñado para microalgas verdes, contiene una mezcla equilibrada de nutrientes y oligoelementos (Wong & Chung, 2017). Se ha demostrado apropiado para promover un crecimiento robusto, también se han empleado en cultivos del género *Chlorella*, obteniendo alto rendimiento en el crecimiento celular (Wong & Chung, 2017; Gupta et al., 2020).

6.4.6. Nitrogen-Phosphorus-Potassium (N.P.K.)

Este fertilizante es una mezcla que contiene principalmente tres nutrientes esenciales: nitrógeno, fósforo y potasio, aunque su principal uso está en el área agrícola, también se emplea en el cultivo de microalgas (Carlson & Capitaine, 2016; Yaakob et al., 2021).

Carlson & Capitaine (2016) mencionan la importancia del nitrógeno en la producción de biomasa, que ayuda a la formación de lípidos, proteínas y carbohidratos. Por su parte, el fósforo interviene en la síntesis de lípidos, ácidos grasos y fosfolípidos, y participa en la formación de energía en forma de ATP. Yaako et al. (2021) recalca que el potasio activa enzimas que intervienen en funciones fisiológicas siendo importante para el mantenimiento de la membrana celular.

6.5. Composición Bioquímica

El género *Chlorella*, posee una composición bioquímica altamente valorada: proteínas (40–60% peso seco), lípidos (10–30%) ricos en ácidos grasos insaturados (C16–C18), y carbohidratos (10–25%), principalmente almidón y polisacáridos estructurales (García et al., 2020; Safi et al., 2019). Además, contiene clorofilas *a* (2–3%) y *b* (0.5–1%), vitaminas (B y E) y minerales como hierro (Fe), zinc (Zn) y magnesio (Mg) (García et al., 2020; Safi et al., 2019).

6.6. Estrés Lumínico en *Chlorella*

En *Chlorella spp.* el estrés lumínico se produce cuando la intensidad de irradiación excede la capacidad fotosintética de las células, donde el fotosistema II no logra utilizar eficientemente el exceso de energía (Zheng et al., 2021). Del mismo modo, Zheng et al. (2021) mencionan que esta condición favorece a la formación de especies reactivas del oxígeno también conocidas como ROS, como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos, los cuales generan daño oxidativo a nivel celular.

Cuando son expuestas a irradiancias superiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, estas activan mecanismos fotoprotectores que alteran su perfil bioquímico: reducción de clorofilas (\downarrow 20–40%) por foto-degradación e incremento de carotenos (\uparrow 30–50%), destacando luteína y β -caroteno; algunas cepas como *C. zofingiensis* sintetizan astaxantina (Li et al., 2019). Metabólicamente, se incrementa la acumulación de fenoles y flavonoides (\uparrow 1.5–

2×), potenciando su capacidad antioxidante (Goiris et al., 2018). También se amplifica el sistema antioxidante enzimático y no enzimático: glutatión reducido (GSH: 2.1→4.8 nmol/mg), α -tocoferol (0.8→2.4 μ g/mg), SOD (12.7→38.5 U/mg), catalasa (9.2→27.1 U/mg) y APX, en función de la dosis lumínica (Zheng et al., 2021; Chokshi et al., 2019).

Del Campo et al. (2021) documentó un aumento significativo de carotenos como luteína, β - caroteno y astaxantina en cepas de *C. zofigiensis*. Del mismo modo, aumentan los compuestos fenólicos y tocoferoles, que cumplen un papel importante en la neutralización de los ROS y en la disipación de la energía excesiva (Ruen-ngam et al., 2019; Del Campo et al., 2021).

6.7. Cuantificación espectrofotométrica

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica analítica fundamental en el análisis de microalgas, que permite cuantificar pigmentos como carotenos y clorofilas mediante sus propiedades de absorción óptica (Gong et al., 2020). En *Chlorella spp.* la determinación espectral de estos pigmentos es esencial para evaluar el estado fisiológico y las respuestas metabólicas frente a condiciones ambientales. Además, los carotenos también actúan como antioxidantes frente al estrés por irradiancia protegiendo las estructuras celulares del daño oxidativo (Del Campo et al., 2021).

Por otra parte, las clorofilas reflejan la eficiencia fotosintética y permiten inferir el potencial bioenergético de la biomasa (Gong et al., 2020). El principio teórico se basa en la ley de Lambert-Beerl, que relaciona absorbancia con concentración y trayectoria óptica, permitiendo un dato preciso de los pigmentos presentes en extractos celulares (Lichtenthaler & Buschmann, 2001). De este modo, ofrece una herramienta no solo cuantitativa sino también interpretativa de los mecanismos adaptativos del metabolismo algal (Zheng et al., 2021).

6.7.1. Curvas de calibración

Ke & Dezhong (2024) mencionan que las curvas de calibración se utilizan para convertir datos de absorbancias en concentraciones de los compuestos que se miden. Cuando se trabaja con compuestos con capacidad antioxidante, es muy común trabajar con ácido ascórbico o trolox como sustancias de referencia (Apak et al., 2018; Ke & Dezhong, 2024).

Estos compuestos permiten trazar una línea recta entre la absorbancia que se obtiene y la cantidad de antioxidante presente. Esa relación es clave para entender e interpretar correctamente los resultados (Apak et al., 2018).

6.8. Método DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

El método 2,2-difenil-1-Picrilhidrazilo o mejor conocido como DPPH es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes extractos naturales, que se incluyen las microalgas como *Chlorella spp.* (Brand- Williams et al., 1995). El principio se basa en la reducción del radical DPPH, que presenta una intensa coloración violeta con un máximo de absorción a 515 nm (Brand-Williams et al., 1995). Cuando un antioxidante dona un electrón o un hidrógeno, neutraliza al radical, así disminuye la absorbancia que se cuantifica espectrofotométricamente (Molyneux, 2004).

El ensayo permite estimar la actividad reductora de compuestos bioactivos presentes en extractos celulares, como polifenoles, metabolitos secundarios y en este caso carotenos (Shalaby & Shanab, 2017). En estudios relacionados a *Chlorella*, el método DPPH ha demostrado ser eficaz para correlacionar el contenido pigmentario con la capacidad antioxidante, especialmente bajo condiciones de estrés que inducen la síntesis de estos compuestos protectores (Khalili et al., 2022). Su simplicidad, bajo costo y reproducibilidad hacen que este método sea particularmente llamativo para estudios de bioactividad (Kähkönen et al., 1999).

6.9. Método ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico))

El método ABTS evalúa la capacidad antioxidante mediante la generación del radical catiónico ABTS^{•+}, que es de color azul/verde (Munteanu et al., 2021; Wolosiak et al., 2021). Los antioxidantes presentes en la muestra reducen este radical, causando una disminución de la absorbancia (Ozgen et al., 2006; Munteanu et al., 2021). Al igual que el DPPH, la decoloración es proporcional a la actividad antioxidante, aunque el ABTS es aplicable tanto a compuestos hidrofílicos como lipofílicos y presenta mayor estabilidad en diferentes condiciones de pH (Ozgen et al., 2006; Wolosiak., 2021).

6.10. Método FRAP (Poder Reductor Férrico)

El ensayo FRAP mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el ion férrico (Fe³⁺) a ferroso (Fe²⁺) en presencia de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina), formando un complejo azul que se cuantifica espectrofotométricamente (Munteanu et al., 2021; Danet, 2021). Este método se basa en la transferencia de electrones y refleja el poder reductor total de los antioxidantes presentes en la muestra (Daner, 2021).

7. MARCO METODOLÓGICO

7.1. Área de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones Biológicas y pasantías Académicas (CIBPA) que se encuentra ubicado en la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

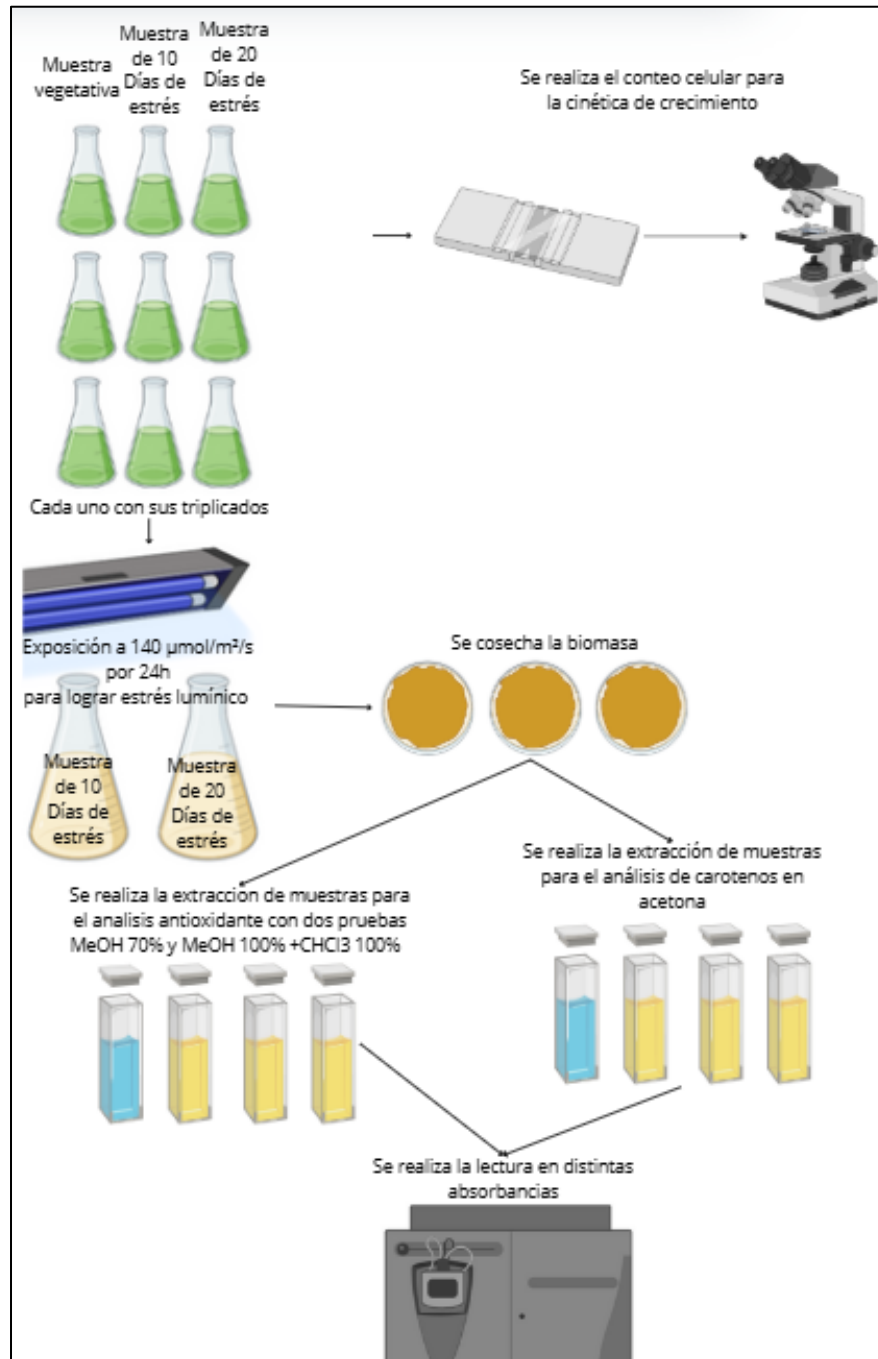
7.2. Obtención de muestras biológicas

En la investigación realizada se utilizó la microalga *Chlorella spp.* del CIBPA registrada con el código PMO22. Con el permiso del MAATE con el código: CUP: 91870000.0000.389574, para el proyecto “Registro de una colección de cepas microalgales con valor biotecnológico para investigación y desarrollo de bioproductos”

Para llevar a cabo la investigación se realizaron dos fases, la fase de mantenimiento y la fase de estrés lumínico como se puede observar en la Figura 2.

Figura 2.

Diseño experimental



7.2.1. Mantenimiento de la microalga *Chlorella* spp.

Para el mantenimiento de la cepa de *Chlorella* spp. se utilizó como medio de cultivo el fertilizante comercial NPK con composición 30:10:10 de la marca Nitrofoska®, en una proporción de 1 g/L disuelto en agua dulce. Este tipo de fertilizante se considera una opción viable por su bajo costo y la facilidad para su adquisición, lo que ha sido demostrado en estudios previos sobre el uso de fertilizantes comerciales como alternativa a medios tradicionales (Lathifah et al., 2021).

El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos, siguiendo los protocolos estandarizados para evitar contaminaciones. La cepa se tomó a partir de placas de agar fertilizada con el medio de cultivo, posterior a ello se procedió a un repique secuencial: Primero, de placa a tubo de cultivo con 30 ml de medio, donde crecía por 5 días; luego, se aumentó el volumen a 90 ml por 5 días, después de 90 ml a 270 ml por otros 5 días, y, por último, de 270 ml a 750 ml por 13 días. A medida que duraba este proceso se fertilizaba el medio en cada paso para asegurar un suministro constante de nutrientes (Ashraf et al., 2011).

La aireación se realizó de forma manual en las primeras fases, utilizando agitación periódica, hasta alcanzar el volumen de 750 ml, se le colocó aireación constante para asegurar el intercambio gaseoso del cultivo.

La iluminación fue de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, y se aplicó un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Figura 3), siguiendo el protocolo propuesto por Mtaki et al. (2021), quienes demostraron que estas condiciones favorecen un crecimiento adecuado de *Chlorella spp.* Este proceso de escalado gradual permite una adaptación progresiva de la microalga a volúmenes mayores y garantiza un crecimiento homogéneo, como lo reportaron Rofidi (2017) y Ezeani y Abu (2019), quienes encontraron que el uso de fertilizantes comerciales combinados con prácticas de cultivo simples puede mantener la biomasa de *Chlorella spp.* de forma eficiente.

Figura 3.

Mantenimiento Chlorella spp.



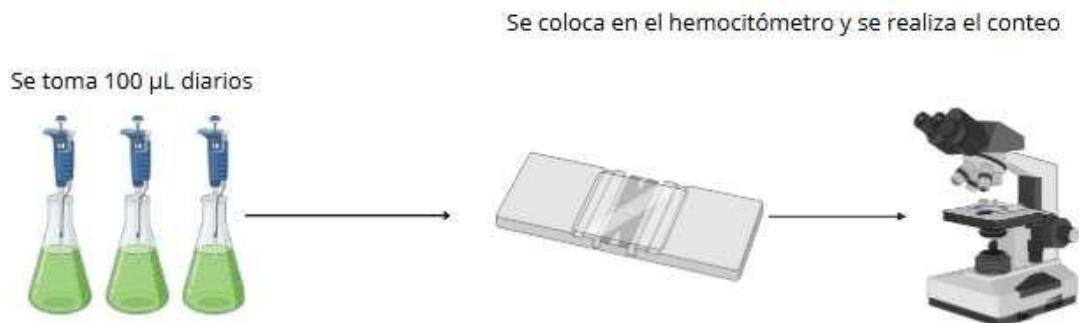
Finalmente, los cultivos a 750 mL se mantuvieron durante 13 días para posteriormente someterse a condiciones de estrés lumínico y nutricional, lo cual es clave para inducir la producción de compuestos antioxidantes como los carotenos (Peñuela et al., 2012; Tran et al., 2023).

7.3. Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de *Chlorella spp.* se elaboró siguiendo la metodología propuesta por Guadalupe e Islas (2017), realizando el conteo celular cada 24 horas, desde el día de la inoculación (Día 0) hasta alcanzar la fase estacionaria (Día 13), como se muestra en la Figura 4. Este procedimiento permitió monitorear el desarrollo celular bajo condiciones controladas, asegurando la recolección de datos consistentes para el análisis de crecimiento (Cudemos, 2017).

Figura 4

Conteo celular en cámara de Neubauer.



Para la cuantificación de la biomasa, se utilizó la fórmula modificada para el cálculo en cámara de Neubauer:

$$\frac{\text{Células}}{\text{ml}} = \frac{\#Células}{0,4\text{ul}} * \frac{1000\text{ul}}{1\text{ml}} * \text{Factor de dilución}$$

Esta fórmula, propuesta por Guajardo (2014), permite determinar con precisión la concentración celular a partir de las mediciones realizadas en la cámara de Neubauer. Además, se calculó la productividad celular utilizando la ecuación descrita por Silva y Graciano (2018):

$$\mu = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

μ : Productividad celular.

x: Concentración de células expresado en células*mL⁻¹.

t: Tiempo en días.

Finalmente, la tasa específica de crecimiento se determinó mediante la fórmula de Guillard (1973), ampliamente utilizada en estudios de microalgas:

$$\alpha = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{T_2 - T_1}$$

Donde:

α : Tasa de crecimiento.

X: Concentración celular en tiempos de fase exponencial.

Ln: Logaritmo natural.

T: Tiempo en días.

Esta ecuación permite obtener un indicador cuantitativo del crecimiento poblacional, ajustado a las fases características del cultivo (Rodríguez, 2021; Ruiz-Marín et al., 2013).

7.4. Estrés de la microalga *Chlorella spp.*

Durante la fase estacionaria, los biorreactores de 750 mL fueron sometidos a estrés lumínico y deficiencia de nutrientes para estimular la acumulación de carotenos, siguiendo el protocolo de Gacheva y Gigova (2014). Los cultivos fueron expuestos a una intensidad luminosa de $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ como se observa en la figura 3, sin un fotoperíodo por lo que se dejó 24h continuas según lo descrito por Jahnke et al. (2019).

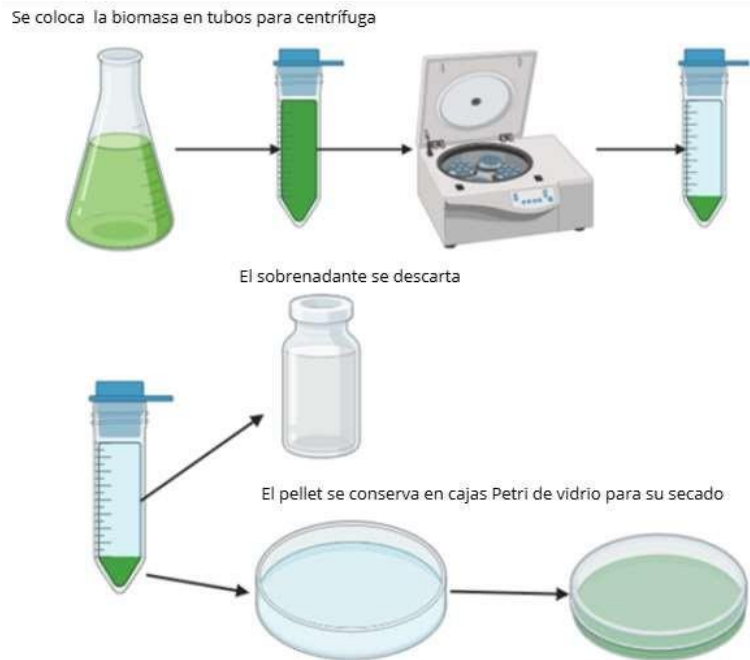
La deficiencia de nutrientes se indujo omitiendo NPK en el medio. Se emplearon tres biorreactores con dos réplicas cada uno, evaluando la respuesta de *Chlorella spp.* al estrés nutricional a los 10 y 20 días.

7.5. Obtención de biomasa

Para la obtención de biomasa se usó una centrifuga Hermle® 306 se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, utilizando frascos de polipropileno de 200 ml. Se separó la biomasa húmeda de cada biorreactor. De acuerdo con la metodología propuesta por Yahia et al. (2007), el secado se realizó en una estufa dejando la biomasa húmeda por 24 h a 38°C, para evitar la degradación de los metabolitos (Figura 5). Finalmente, la biomasa se almacena en congelación a 4°C para su posterior análisis.

Figura 5.

Método de obtención de biomasa.



7.6. Extracción de carotenos

La extracción de carotenos se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Arredondo-Vega et al. (2017), con ajustes para optimizar la recuperación del pigmento. Se pesaron 0.3 g de biomasa seca de *Chlorella spp.*, a los cuales se les añadió 10 mL de acetona al 90%. La mezcla se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente en oscuridad, para evitar la degradación de los compuestos por exposición a la luz, como lo recomiendan Cerrillo et al. (2022).

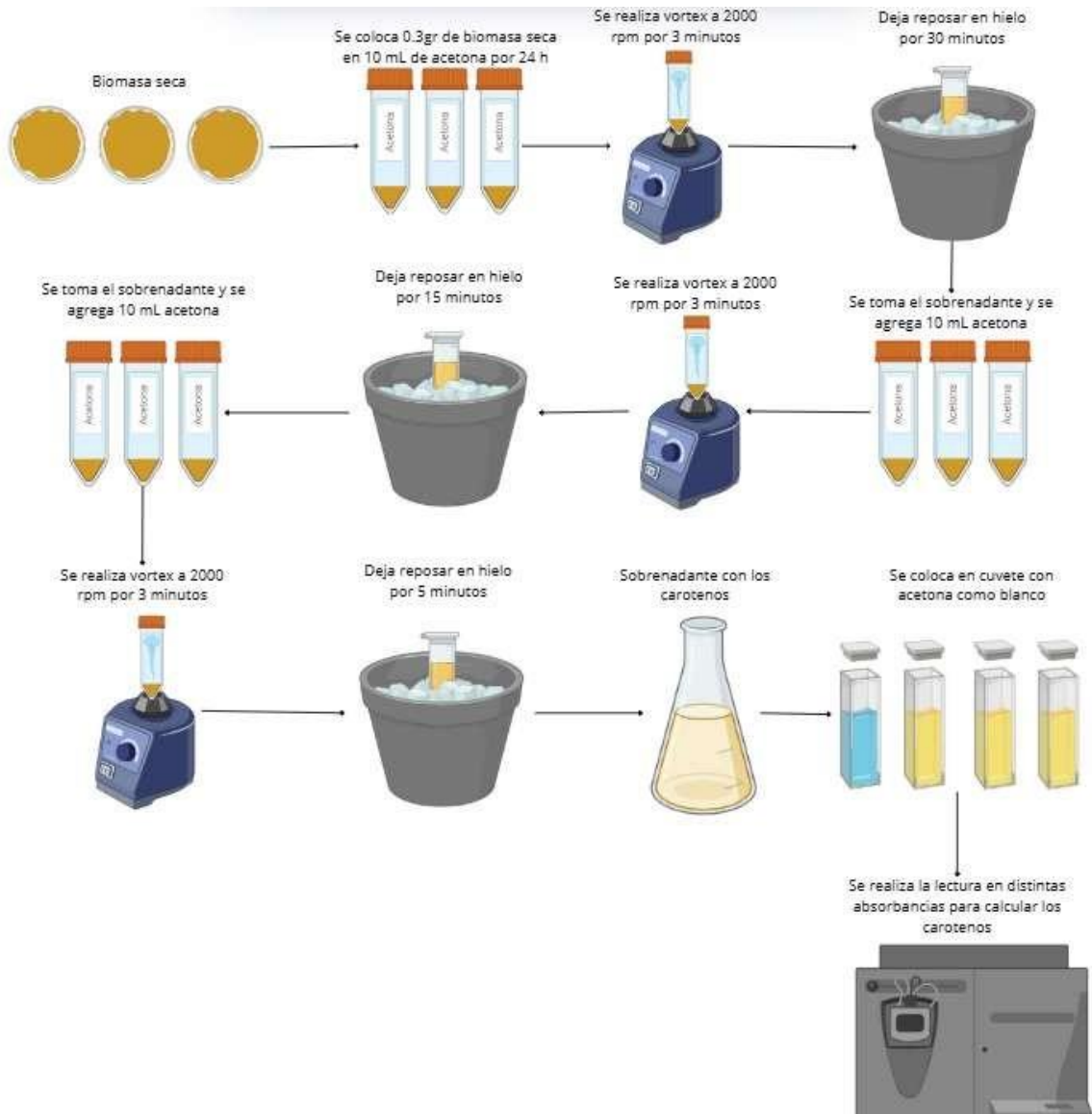
Posteriormente, se agitó la muestra en un vórtex a 2000 rpm por 3 minutos, y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos para favorecer la liberación de los carotenos. El sobrenadante fue cuidadosamente recolectado en un frasco ámbar mantenido en hielo, minimizando la exposición a la luz y al oxígeno para evitar la degradación oxidativa (Romero et al., 2008).

A la biomasa restante se le añadió nuevamente 10 mL de acetona al 100% y se repitió el proceso de vortex a 2000 rpm por 3 minutos y reposo en hielo por 15 minutos, como indican Aguado et al. (2022). El sobrenadante se transfirió a un frasco ámbar con la primera fracción, y se repitió el mismo procedimiento, con un reposo final de 5 minutos

Figura 6.

Figura 6.

Metodología de extracción de carotenos utilizada para Chlorella spp.



Se combinaron los 3 extractos de sobrenadantes obtenidos así asegurar una mayor eficacia en la extracción de pigmentos. Rubio et al. (2017) menciona que la repetición de

los ciclos de extracción es fundamental para obtener una mayor concentración de carotenos.

7.6.1. Determinación espectrofotométrica de pigmentos

La medición se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS modelo Hanon® I5. Las muestras se colocaron en cubetas de vidrio, y las lecturas se tomaron a longitudes de onda de 480, 647 y 664 nm, utilizando acetona pura como blanco, según el procedimiento descrito por Silveira-Front et al. (2018). La concentración de carotenos se calculó aplicando las siguientes ecuaciones:

$$Ca = 11.93A_{664} - 1.93A_{647}$$

$$Cb = 20.36A_{647} - 5.5A_{664}$$

$$Cx + b = Ca + Cb$$

$$\beta = 4,0 * A_{480}$$

Donde:

Ca: Clorofila a

Cb: Clorofila b

Cx+b: Clorofilas totales

β : Carotenos

A: Absorbancia (480, 647, 664)

7.7. Preparación de muestras

La preparación de muestras se realizaron en el laboratorio de “preparación de muestras” de la Universidad Estatal de Bolívar (UEB) donde se emplearon dos métodos de extracción para obtener el primer extracto (E1) a base de metanol al 70% y el segundo extracto (E2) a base de metanol al 100% y cloroformo al 100%.

En el primer extracto (E1), se pesaron 120 mg de biomasa seca de *Chlorella spp.* y se colocaron en tubos Eppendorf ámbar para evitar la degradación por la luz. A cada tubo se le añadieron 1500 μ L de metanol al 70%, y se agitó en vórtex durante 10 minutos para favorecer la dispersión de la biomasa.

Posteriormente, las muestras se sometieron a sonicación por 10 minutos, lo cual ayuda a romper las células y liberar los compuestos bioactivos (Iovine et al., 2019). Después, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un balón aforado ámbar.

Este proceso de extracción (desde la adición de metanol hasta la recolección del sobrenadante) se repitió cuatro veces hasta que la biomasa quedó prácticamente incolora,

lo que indica una extracción eficiente (Fernández,0 2015). Finalmente, el volumen total se ajustó a 10 mL con metanol al 70%.

Para el segundo extracto (E2), se adaptó el protocolo de Bligh y Dyer (1959), con modificaciones de Wu et al. (2020). Se colocaron 100 mg de biomasa en tubos Eppendorf junto con perlas de acero inoxidable y se homogenizó mediante vórtex durante 1 minuto, siguiendo un procedimiento mecánico de disrupción que favorece la ruptura de la pared celular (Ma, 2012).

De este homogenizado, se tomaron 15 mg y se transfirieron a tubos ámbar para minimizar la degradación fotoinducida. A cada muestra se le agregaron 100 μ L de agua destilada, se agitó en vórtex durante 15 segundos y se incubó a 4°C por 30 minutos, para facilitar la lisis celular, como se sugiere en Lin et al. (2019). Posteriormente, se añadieron 500 μ L de metanol al 100% y 500 μ L de cloroformo al 100%, agitando 15 segundos después de cada adición para asegurar la mezcla adecuada de fases, como proponen Routray et al. (2017).

Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos a 10°C, y el sobrenadante se recolectó en un balón aforado ámbar de 5 mL. Este procedimiento se repitió hasta cuatro veces, hasta que el pellet quedó incoloro, indicando la extracción completa de pigmentos, como sugiere Folch et al. (1957). Finalmente, se ajustó el

volumen a 5 mL con metanol al 100% y las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su análisis.

7.8. Curva de calibración de trolox para el ensayo DPPH

7.8.1. Preparación de soluciones de trabajo

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó una solución madre de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico) a una concentración de 1000 µmol/L, disolviéndolo en metanol al 100%, siguiendo el protocolo descrito por Prior et al. (2005). Esta solución madre sirvió como punto de partida para realizar diluciones seriadas que permitieron obtener concentraciones de trabajo entre 200 y 800 µmol/L. Para cada dilución se aplicó la formula:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde:

C_1 es concentración inicial (1000 µmol/L)

V_1 es el volumen requerido de la solución madre

C_2 es la concentración buscada (200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 µmol/L)

V_2 es el volumen final (1000 µL)

Paralelamente, se preparó una solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) a una concentración de 0,06 mmol/L en 50 mL de metanol, la cual se protegió de la luz durante todo el proceso debido a su alta sensibilidad a la fotodegradación (Mishra et al., 2012). Este paso es fundamental para evitar alteraciones en la capacidad antioxidante del DPPH, como lo han documentado Tovar (2013) y García-Barrientos et al. (2025) en sus estudios sobre antioxidantes en extractos de plantas y hongos.

Además, se consideraron las recomendaciones de Benítez-Estrada et al. (2020), quienes enfatizan la importancia de mantener condiciones estables para evitar errores en la medición de la actividad antioxidante. La curva de calibración resultante se utilizó como referencia para calcular la actividad antioxidante de los extractos de *Chlorella spp.* estresada.

Este proceso permite comparar los resultados con un antioxidante de referencia, como el trolox, y facilita la interpretación de los datos obtenidos, asegurando la fiabilidad del ensayo (Iradi, 2016; Lugo et al., 2014). Finalmente, las soluciones preparadas se almacenaron en frascos ámbar y a bajas temperaturas hasta su uso, para evitar su degradación (Soteldo et al., 2015).

7.8.2. Procedimiento experimental

Para llevar a cabo el análisis de la capacidad antioxidante, se prepararon mezclas para cada concentración de trolox (200, 400, 600 y 800 $\mu\text{mol/L}$). Se añadió 25 μL de cada dilución de trolox a 975 μL de la solución de DPPH (0,06 mmol/L) en tubos Eppendorf ámbar para evitar la fotodegradación, tal como lo indica Blois (1958).

Las mediciones se realizaron por triplicado para asegurar la precisión y reproducibilidad de los resultados, siguiendo buenas prácticas experimentales sugeridas en estudios de antioxidantes naturales (Tovar, 2013; García-Barrientos et al., 2025). Una vez preparadas las mezclas, se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos, tiempo recomendado para permitir que ocurra la reacción entre el DPPH y los compuestos antioxidantes presentes en las muestras, según lo reportado por Sánchez-Moreno et al. (1998).

Finalizado el tiempo de incubación, se midió la absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, utilizando como blanco una mezcla compuesta por 975 μL de solución de DPPH y 25 μL de metanol puro. Esta referencia permitió corregir las lecturas y eliminar posibles interferencias del disolvente en la medición (Sharma & Bhat, 2009; Lugo et al., 2014).

La absorbancia neta de cada muestra se calculó restando el valor del blanco a la absorbancia de las muestras tratadas. Este paso es fundamental para obtener resultados precisos y comparables, ya que elimina la influencia del solvente en el análisis, como se ha documentado en otros estudios sobre técnicas espectrofotométricas para la determinación de capacidad antioxidante (Huang et al., 2005; Soteldo et al., 2015).

Finalmente, los datos obtenidos fueron utilizados para construir la curva de calibración de trolox y calcular la capacidad antioxidante de los extractos de *Chlorella spp.*, expresados como equivalentes de trolox (TEAC). Este procedimiento experimental permite una comparación confiable entre el antioxidante estándar y las muestras de microalgas, facilitando la interpretación de los resultados y su discusión frente a estudios similares (Benítez-Estrada et al., 2020; Iradi, 2016).

7.8.3. Análisis de datos

Los valores de absorbancia neta se graficaron en función de las concentraciones de trolox ($\mu\text{mol/g}$), ajustándose los datos a un modelo de regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados (Miller & Miller, 2018). De esta grafica se obtuvieron los parámetros clave: pendiente (m), que refleja la sensibilidad del método; intersección (b), correspondiente a la absorbancia en ausencia de trolox; y el coeficiente de determinación (R^2), que indica el grado de linealidad (se consideró aceptable un $R^2 \geq 0.98$).

La ecuación resultante ($y = mx + b$) permitió posteriormente calcular la actividad antioxidante de muestras desconocidas en equivalentes de trolox (TEAC), facilitando la comparación con estudios previos (Brand-Williams et al., 1995).

7.9. Evaluación de la actividad antioxidante con ensayo DPPH

7.9.1. Cuantificación de la actividad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de *Chlorella spp.*, se empleó el método de DPPH descrito por Brand-Williams et al. (1995), con adaptaciones para su aplicación en extractos de microalgas. Cada muestra fue analizada por triplicado, asegurando la reproducibilidad de los resultados (Kuskoski et al., 2005). Para ello, se mezclaron 25 μL del extracto previamente aforado con 975 μL de la solución de DPPH (0,06 mmol/L) en tubos Eppendorf de color ámbar, protegiendo la reacción de la luz para evitar la degradación de los radicales libres.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas en oscuridad durante 30 minutos, tiempo necesario para garantizar la interacción completa entre el radical DPPH y los compuestos antioxidantes presentes, como lo recomiendan García et al. (2016). Transcurrido el tiempo de incubación, la absorbancia se midió a 515 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Se empleó como blanco una mezcla de 975 μL de DPPH con

25 μL de metanol, lo que permitió eliminar interferencias ópticas del solvente y obtener resultados más precisos, siguiendo las recomendaciones de Ovando et al. (2022).

La absorbancia neta se calculó restando la absorbancia del blanco a cada una de las réplicas. Este paso es fundamental para minimizar errores asociados a la interferencia de la matriz del solvente y garantizar resultados comparables (Barrón-Yáñez et al., 2011).

Finalmente, los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición, lo que permitió cuantificar la actividad antioxidante del extracto en comparación con el control. Este método es ampliamente aceptado para la evaluación de la capacidad antioxidante de diversas matrices biológicas y se considera una herramienta sencilla y confiable en estudios de microalgas (Gutierrez et al., 2008; Mesa-Vanegas et al., 2010).

7.9.2. Cálculo de la concentración antioxidante

La concentración de antioxidantes en $\mu\text{mol/g}$ se determinó mediante la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración de trolox ($y = mx + b$), donde:

$$\text{Concentracion } \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{g}}\right) = \frac{\text{Absorbancia neta} - b}{m}$$

Donde:

m es la pendiente de la curva

b es la intersección en el eje y

Para expresar la actividad antioxidante en $\mu\text{mol Eq. trolox/g}$ de muestra, se aplicó la siguiente fórmula (Prior et al., 2005):

$$\mu\text{mol} \frac{\text{Eq. trolox}}{\text{g}} = \frac{\text{Conc.} \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) * \text{Vol. de aforo (L)} * \text{FD}}{\text{Peso de muestra (g)}}$$

7.10. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con el objetivo de evaluar la distribución de las variables. Al no cumplir los supuestos de normalidad ($p < 0,05$), se determinó el uso de métodos no-paramétricos. Para comparar las diferencias entre los tratamientos, se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, posterior a ello se efectuó el análisis post hoc mediante la prueba de Dunn con ajuste p -valores por el método de Bonferroni. Por último, con la finalidad de establecer relaciones entre la concentración de carotenos y la capacidad antioxidante, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (ρ), adecuado para variables de distribución no-paramétrico.

8. RESULTADOS

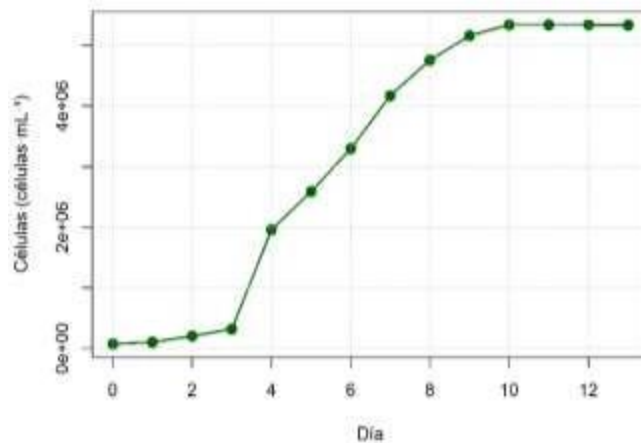
8.1. Cinética de crecimiento

8.1.1. Dinámica de crecimiento celular bajo condiciones controladas

Durante el periodo experimental de 10 días, la muestra aislada mostró una cinética de crecimiento típica con fases de aceleración, exponencial y estacionaria bien diferenciadas (Figura 7). La concentración celular inicial fue de $7,25 \times 10^4$ cel/mL, alcanzando un máximo de $5,34 \times 10^6$ cel/mL al día 10. Se observó un crecimiento exponencial pronunciado entre los días 3 y 6, pasando de $3,24 \times 10^5$ a $3,30 \times 10^6$ cel/mL. Lo que indica que es un ambiente favorable y eficiente para el desarrollo del alga bajo las condiciones a las que se expusieron.

Figura 7.

Cinética de crecimiento de Chlorella spp. en condiciones controladas.



Nota: Días 1-3, fase de aceleración, días 3-10, fase exponencial, 11-12, fase estacionaria.

8.1.2. Tasa de crecimiento y productividad celular

La tasa de crecimiento específica (α) fue calculada mediante la ecuación de Guillard (1973), resultando en un valor de 0.773 d^{-1} durante el intervalo de mayor actividad exponencial (días 3 a 6). Este valor es indicativo de un cultivo saludable y eficiente, ya que se encuentra dentro del rango óptimo reportado para cepas de *Chlorella spp.* bajo condiciones controladas ($0.5\text{--}0.8 \text{ d}^{-1}$), según estudios recientes sobre su dinámica de crecimiento (Mardalisa et al., 2022; Chilmawati, 2010; Kuo et al., 2015). Este crecimiento activo puede atribuirse a una adecuada disponibilidad de nutrientes, luz y temperatura, lo cual favorece la división celular, síntesis de clorofila y acumulación de compuestos primarios.

Por otro lado, la productividad celular (μ), estimada como el incremento neto de biomasa en función del tiempo, alcanzó $5,27 \times 10^5 \text{ cel/mL/día}$. Este rendimiento representa un crecimiento robusto y sostenido, destacando el día 8 como el punto de máxima eficiencia fotosintética, momento en el que las células alcanzan su capacidad metabólica óptima antes del ingreso a la fase estacionaria. Esto demuestra un crecimiento normal en la fase exponencial como lo reportan Gopalakrishnan et al. (2018) con una tasa de $8 \times 10^5 \text{ cel/mL/día}$. Fisiológicamente, este comportamiento refleja que la microalga se encuentra en una fase anabólica activa, caracterizada por división rápida, síntesis proteica y crecimiento celular balanceado.

Tabla 1

Productividad celular y tasa de crecimiento de Chlorella spp. en condiciones controladas.

Especie	Días	Concentración inicial x10 ⁴	Concentración final x10 ⁶	Tasa de crecimiento	Productividad celular x10 ⁵ cel/mL/día
<i>Chlorella spp</i>	10	7,25	5,34	0,77	5,27

8.2. Producción de carotenos bajo estrés lumínico

8.2.1. Concentración de carotenos bajo diferentes condiciones de luz

La concentración de carotenos mostró una notable disminución en relación con el aumento del estrés lumínico durante 10 y 20 días. El grupo control (MV) obtuvo la mayor concentración con $2.15 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{mg}$ seguido por la muestra de 10 días de estrés (M10D) con $0,93 \pm 0,16 \mu\text{g}/\text{mg}$, y por último la muestra de 20 días de estrés (M20D) con $0,51 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ (Tabla 2). Este patrón denota que un nivel moderado de irradiancia puede estimular la producción de carotenos, mientras que un exceso puede inducir daño foto-oxidativo.

Tabla 2

Contenido de clorofilas y carotenos totales

Grupo	Ca (mg/L)	Cb (mg/L)	Cx+b (mg/L)	β (mg/L)
MV	8.15 ± 0.93	2.87 ± 0.40	11.02 ± 1.32	2.15 ± 0.26
M10D	1.80 ± 0.23	0.41 ± 0.22	2.21 ± 0.45	0.93 ± 0.16
M20D	0.95 ± 0.04	0.43 ± 0.06	1.38 ± 0.10	0.51 ± 0.03

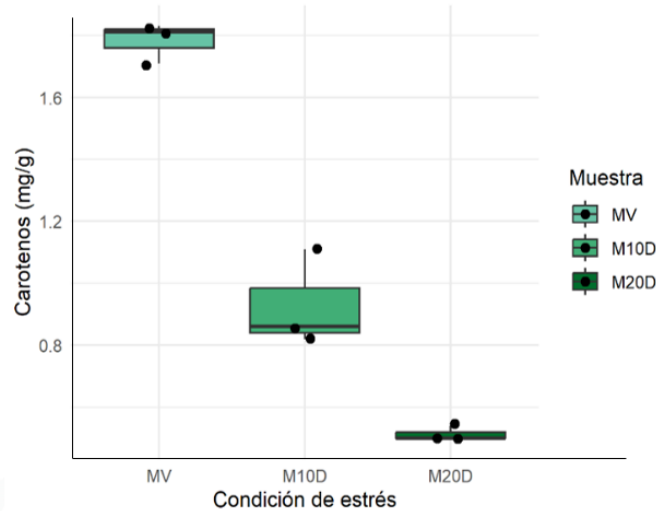
8.2.2. Análisis estadístico del efecto del estrés

El análisis estadístico de Kruskal-Wallis reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 0,026$), indicando que al menos uno de los grupos presentaba una concentración de carotenos distinta. La prueba post hoc de Dunn mostró una diferencia significativa entre MV y M20D ($p.\text{adj} = 0,021$), pero no entre MV y M10D ni entre M10D y M20D. Este patrón sugiere que el estrés prolongado (20 días) puede afectar negativamente la síntesis o estabilidad de los carotenos en *Chlorella spp* (Figura 8).

Desde el punto de vista fisiológico, se esperaría un aumento de carotenoides bajo estrés, ya que estos actúan como antioxidantes protectores frente a la fotooxidación (Gacheva y Gigova, 2014). Sin embargo, en esta investigación se observó que la muestra vegetativa (MV) presentó mayor concentración de carotenos totales, lo cual puede explicarse de forma que, en fases de crecimiento activo, la microalga produce carotenos asociados a la formación de cloroplastos funcionales y a la integridad del sistema fotosintético.

Figura 8.

Concentración de carotenos bajo estrés lumínico.



Nota: Se observa que la muestra vegetativa (MV) tiene mayor cantidad de carotenos en comparación con las muestras estresadas.

8.3. Capacidad antioxidante

8.3.1. Capacidad antioxidante según el primer extracto E1

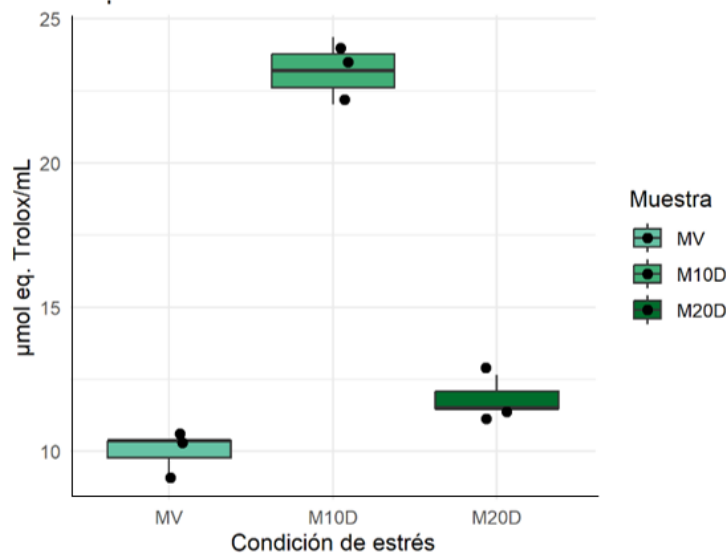
La capacidad antioxidante se evaluó mediante dos ensayos complementarios (E1 y E2), evidenciando variaciones notables según el tratamiento aplicado. En el método E1 (Figura 9), M10D registró la mayor actividad antioxidante con $23,20 \pm 1,17 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox}}/\text{g}$, mientras que MV y M20D presentaron valores menores $9,98 \pm 0,67$ y $11,88 \pm 0,67 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox}}/\text{mL}$, respectivamente como se observa en la Tabla 3. Esto probablemente se debe a la exposición a un estrés moderado por ello, la microalga activa rutas metabólicas para la síntesis de metabolitos antioxidantes como SOD, CAT o AsA-GSH para evitar la fotoxidación (Pradhan et al., 2020). Sin embargo, cuando se expone

durante un estrés lumínico intenso causa un daño celular por lo que no se generan metabolitos antioxidantes en la célula.

El análisis de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas ($p= 0,025$), y la prueba de Dunn mostro diferencia significativa entre M10D y MV ($p. adj= 0,020$), sugiriendo que el estrés moderado puede inducir la acumulación de compuestos antioxidantes distintos a los carotenos.

Figura 5.

Capacidad antioxidante obtenida mediante el primer extracto.



Nota: La muestra estresada a 10 días, obtuvo una mayor cantidad antioxidante, en comparación a la muestra estresada a 20 días y la muestra vegetativa

Tabla 3

Contenido de carotenos y evaluación antioxidante con ambos extractos.

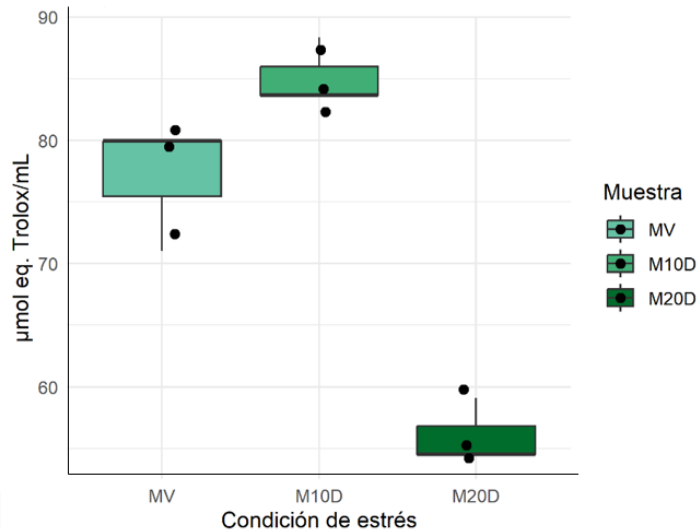
Muestra	Carotenos (ug/mg)	Antioxidante E1 ($\mu\text{mol Eq trolox/g}$)	Antioxidante E2 ($\mu\text{mol Eq trolox/g}$)
MV	2,15 \pm 0,26	9,98 \pm 0,67	76,96 \pm 5,16
M10D	0,93 \pm 0,16	23,20 \pm 1,17	85,23 \pm 2,70
M20D	0,51 \pm 0,03	11,88 \pm 0,67	81,00 \pm 8,97

8.3.2. Capacidad antioxidante según el segundo extracto E2

En el método E2 (Figura 10), también M10D presentó la mayor capacidad antioxidante ($85,23 \pm 2,70 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox/g}}$), seguido de M20D ($81,00 \pm 8,97 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox/g}}$) y MV ($76,96 \pm 5,16 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox/g}}$). Aunque no se observaron diferencias significativas entre los grupos tras la corrección de Bonferroni, la tendencia apoya la hipótesis de que condiciones moderadas de estrés inducen respuestas antioxidantes elevadas. Se logró observar una diferencia entre el primer extracto (E1) y el segundo extracto (E2) esto debido a los dos métodos de extracción realizados.

Figura 10.

Capacidad antioxidante obtenida mediante el segundo extracto.



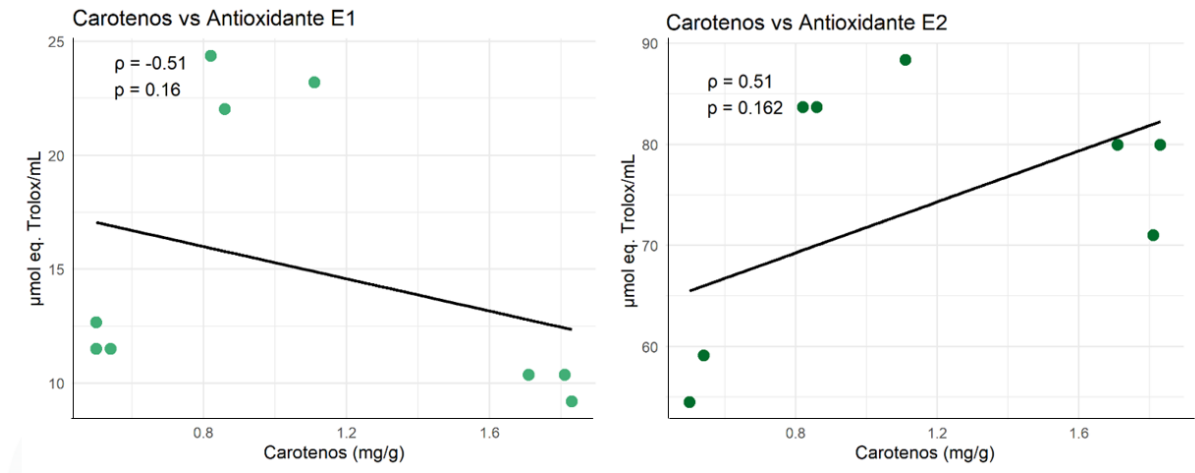
Nota: Se observa una disminución de capacidad antioxidante para la muestra estresada 20 días (M20D), en comparación a los otros extractos.

8.3.3. Relación entre carotenos y capacidad antioxidante

El coeficiente de correlación de Spearman demostró que no se encontró una correlación significativa en ninguno de los casos E1: $\rho = -0,52$; $p = 0,16$; E2: $\rho = 0,51$; $p = 0,16$ (Figura 11), lo cual indica que, bajo las condiciones evaluadas, la concentración total de carotenos no se relaciona directamente con la capacidad antioxidante medida.

Figura 11.

Correlación de Spearman entre carotenos contra el primer extracto y segundo extracto.



Nota: Los valores de $p < 0.05$ demuestran que no existe correlación en ninguno de los casos.

9. DISCUSIONES

Los resultados del estudio realizado a la muestra de *Chlorella spp.* aislada demostraron la cinética de crecimiento de 13 días de cultivo de las microalgas Chlorophytas, diferenciando las fases: aceleración, exponencial y estacionaria. La tasa de crecimiento (μ) alcanzó un valor de $0,773 d^{-1}$, y la productividad celular máxima fue de $5,27 * 10^5$ Cel/mL/día, donde se observa el octavo día como el punto de máxima eficiencia.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gómez-Luna, Tormos-Cedeño y Ortega-Díaz (2022), quienes describen tasas de crecimiento superiores a $0,6 d^{-1}$ para *Chlorella vulgaris* en cultivos *in vitro*. Del mismo modo, Coronado-Reyes, Salazar Torres, Juárez-Campos y González-Hernández (2020) reportaron tasas cercanas a $0,8 d^{-1}$ en medios enriquecidos. Por su parte, Gómez, Álvarez & Rivero (2011) demostraron que el crecimiento de *Chlorella vulgaris* varía según la disponibilidad de nutrientes en el medio.

Por lo tanto, se reafirma que *Chlorella spp.* posee un alto potencial de adaptación a condiciones controladas, dependiendo de los distintos factores como la intensidad lumínica, tiempo de exposición al estrés lumínico y la disponibilidad de nutrientes pueden influir significativamente en el crecimiento (Brito et al., 2016).

La concentración de carotenos del estudio demostró una disminución progresiva según se incrementa el estrés lumínico: $2,15 \pm 0,26$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en el grupo control (MV), $0,93 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en M10D, y $0,51 \pm 0,03$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en M20D. Sari et al. (2025) obtuvo un valor de $1,75$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en muestras estresadas con un nivel bajo de estrés, exponiéndolo a 30 minutos de intensidad lumínica. El patrón sugiere que un nivel moderado de irradiancia puede inducir una respuesta fotoprotectora inicial, mientras que un exceso de irradiancia causa daño foto-oxidativo y degradación de estos compuestos (Gómez-Luna et al., 2022).

Comparativamente, Coronado-Reyes et al. (2020) reportaron concentraciones de hasta $2,3$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ en *Chlorella vulgaris*, bajo condiciones de estrés lumínico moderado y restricción de nitrógeno, mientras que Brito et al. (2016). A diferencia de, Sandoval, Naranjo y Casas (2023) y Casa, Naranjo y Herrera (2023) demostraron la capacidad de *Chlorella vulgaris* en la producción de metabolitos fotoprotectores a partir de extractos cultivados bajo condiciones de estrés controlado, sin embargo, no especificaron concentraciones exactas.

Los resultados sugieren que las condiciones de cultivo, especialmente los factores de estrés lumínico y estrés nutritivo son determinantes para la acumulación de carotenos (León, 2021).

Los resultados del ensayo de capacidad antioxidante con el método DPPH evidenciaron que el estrés moderado (M10D) estimuló la mayor actividad antioxidante en ambos extractos: $23,20 \pm 1,17 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox}}/\text{g}$ (E1) y $85,23 \pm 2,70 \mu\text{mol}_{\text{Eqtrolox}}/\text{g}$ (E2), mientras que, en MV y M20D presentaron valores significativamente menores. Estos resultados fueron comparados con datos obtenidos por Romero (2019) , quien evaluó la capacidad antioxidante de *Chlorella sp.* mediante equivalentes de ácido ascórbico (AAEAC), obteniendo valores de $29,08 \pm 2,37 \text{ mg AA/g}$ en extracto con diclorometano (DCM), y $24,42 \pm 2,9 \text{ mg AA/g}$ en el extracto etanólico EtOH:H₂O 95:5. Ambos fueron significativamente superiores respecto a extractos en hexano y mezclas con mayor proporción de agua.

Esto coincide con Gómez-Luna et al. (2022), quienes destacaron que la exposición a estrés moderado favorece la acumulación de metabolitos de carácter antioxidante en *Chlorella vulgaris*. Del mismo modo, López (2022) demostró que nanoformulados de *Chlorella vulgaris* también podrían actuar como agentes antioxidantes en aplicaciones agrícolas.

La notable ausencia de una correlación significativa entre carotenos y capacidad antioxidante de ambos extractos (E1: $\rho = -0,52$; $p = 0,16$ y E2: $\rho = 0,51$; $p = 0,16$) demuestra que, además de carotenos, otros metabolitos como pueden ser flavonoides, polifenoles o ácidos grasos insaturados presentes en la microalga, que podrían estar contribuyendo a la

actividad antioxidante, como lo proponen Coronado-Reyes et al. (2020) y Mercado & Álvarez (2022) en estudios relacionados sobre biorrefinerías de microalgas.

Los resultados enfatizan la necesidad de aplicar técnicas de caracterización molecular, tales como HPLC o LC-MS, que ayudarían a definir los compuestos responsables de la actividad antioxidante (León, 2021).

10. CONCLUSIONES

La evaluación del crecimiento de *Chlorella spp.* en el medio NPK permitió establecer parámetros óptimos para su desarrollo, evidenciando la tasa específica de crecimiento y una productividad celular normal. En la curva de crecimiento se diferencian las fases como la fase de latencia y la exponencial, siendo el octavo día donde se encontró mayor rendimiento celular.

En relación con la producción de carotenos se obtuvo que la intensidad lumínica genera una disminución en la producción de carotenos, donde se registró que la muestra control obtuvo mayor cantidad con relación a las muestras estresadas del día 10 y día 20. Demostrando que a 10 días de estrés lumínico constante afecta en la síntesis de carotenos como mecanismo de defensa, pero a un estrés lumínico de 20 días provoca su degradación.

El análisis de la capacidad antioxidante demostró que el grupo expuesto a un nivel moderado de estrés (M10D) alcanzó una mayor actividad antioxidante en ambos extractos, mientras que los grupos MV y M20D presentaron una actividad antioxidante menor. Sin embargo, no se logró una correlación significativa entre la concentración de carotenos y la capacidad antioxidante lo que sugiere que al momento del estrés otros metabolitos antioxidantes influyen en la actividad antioxidante. Demostrando así que no

existe una relación significativa entre la concentración de carotenos y la capacidad antioxidante de *Chlorella spp.*

Se evidencia la necesidad de identificar otros compuestos bioactivos presentes en *Chlorella spp.*, tales como flavonoides, polifenoles o ácidos grasos insaturados, que podrían contribuir a la actividad antioxidante. Además, con estos resultados se logró identificar que el estrés lumínico moderado es una opción útil para inducir la actividad antioxidante.

11.RECOMENDACIONES

Se pueden usar métodos como el HPLC o el LC-MS para conocer con más detalle los compuestos que contiene la microalga *Chlorella spp.*

Evaluar la concentración de carotenos en otros medios de cultivo como Guillard F/2 o BG11, de esta forma determinar si la concentración de carotenos puede variar dependiendo del medio de cultivo.

Incorporar diferentes tipos de estrés como la limitación de nitrógeno o estrés salino, de modo que se pueda comparar la eficacia del estrés lumínico en relación de a su capacidad antioxidante.

Realizar un ensayo menor de estrés, exponerlo a 5 días y periodos más intercalados.

REFERENCIAS

- Abdelkarim, O., Gheda, S., Ismail, G., & Abo-Shady, A. (2019). Phytochemical Screening and antioxidant activity of *Chlorella vulgaris*. 41. 76-86. 10.21608/djs.2020.139231.
- Aguado, H. C. C., Rojas, G. V. C., & Pérez, T. I. (2022). Irradiación infrarroja: un método novedoso para asistir la extracción de pigmentos fotosintéticos en microalgas. *revistas.uaz.edu.mx*. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiasust.v7i1.1646>
- Agustina, S., Aidha, N., & Oktarina, E. (2021). The extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris* for cosmetics. *IOP Conference Series Materials Science and Engineering*, 1011(1), 012057. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/1011/1/012057>
- Ajitha, V., Sreevidya, C. P., Sarasan, M., Park, J. C., Mohandas, A., Singh, I. S. B., Puthumana, J., & Lee, J. (2021). Effects of zinc and mercury on ROS-mediated oxidative stress-induced physiological impairments and antioxidant responses in the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science And Pollution Research*, 28(25), 32475-32492. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12950-6>
- Ali, H. E. A., El-Fayoumy, E. A., Rasmy, W. E., Soliman, R. M., & Abdullah, M. A. (2020). 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>
- Ali, S. S., Hassan, L. H., & El-Sheekh, M. (2024). Microalgae-mediated bioremediation: current trends and opportunities-a review. *Archives Of Microbiology*, 206(8). <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04052-x>
- Ashraf, M., Iqbal, M., Rashid, T., Ayub, M., Zafar, A., Naqvi, S., & Naeem, M. (2011). Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers for Mass Culture of Freshwater Algae, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Agriculture and Biology*. 13. Research gate. https://www.researchgate.net/publication/386867813_Replacement_of_Expensive_Pure_Nutritive_Media_with_Low_Cost_Commercial_Fertilizers_for_Mass_Culture_of_Freshwater_Algae_Chlorella_vulgaris
- Barrón-Yáñez, R., García-Mateos, M., Soto-Hernández, M., Colinas-León, T., & Kite, G. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Revista fitotecnica mexicana*, 34(3), 151-157. Recuperado en 01 de junio de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000300005&lng=es&tlng=es.
- Benítez-Estrada A, Villanueva-Sánchez J, González-Rosendo G, et al. Determination of the total antioxidant capacity of food and human plasma by

- photochemiluminescence: Correlation with spectrophotometric (FRAP) and fluorometric (ORAC) assays. *TIP Rev Esp Cienc Quim Biol.* 2020;23(1):1-9.
- Bodenes, P. (2017). *Study of the application of pulsed electric fields (PEF) on microalgae for the extraction of neutral lipids.* <https://theses.hal.science/tel-01540436>
- Brito., Brito, D., Caña, E., Guevara, M. & Colivet, J. (2016). Effect of three sources of nutrients on biomass and pigment production of freshwater microalgae *Hyaloraphidium contortum*. *REVISTA BIO CIENCIAS.* DOI:[10.15741/revbio.04.01.02](https://doi.org/10.15741/revbio.04.01.02)
- Bulut, O., Köse, I. E., Sönmez, Ç., & Öktem, H. A. (2024). Antioxidant activity of *Micractinium* sp. (Chlorophyta) extracts against H₂O₂ induced oxidative stress in human breast adenocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63960-6>
- Carrasco, A. (2016). *Caracterización y bioactividad antioxidante y antienzimática de aceites esenciales de lavandas, tomillos y oréganos de Murcia = Characterisation and antioxidant and antienzymatic bioactivities of essential oils of lavender, thyme and oregano from Murcia.* <http://hdl.handle.net/10201/47447>
- Casas, L., Naranjo, K. & Herrera, J. (2023). Producción de protector solar a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Ingeniería e Innovación.* Recuperado en 20 de mayo de 2025, de https://www.academia.edu/108007809/Producción_de_protector_solar_a_partir_de_Chlorella_vulgaris
- Cerrillo, G., Ibarra, T., & Correa-Aguado, H. (2022). Irradiación infrarroja: un método novedoso para asistir la extracción de pigmentos Fotosintéticos en microalgas. 7. 96-105. [10.57737/biotecnologiaysust.v7i1.1646](https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v7i1.1646).
- Chilmawati, D. (2010). The Used of Different Culture Medium Effect on The Growth Of *Chlorella* Sp. *SAINTEK PERIKANAN : Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*, 6, 71-78. <https://doi.org/10.14710/IJFST.6.1.71-78>.
- Choochote, W., Suklampoo, L. & Ochaikul, D. Evaluation of antioxidant capacities of green microalgae. *J Appl Phycol* **26**, 43–48 (2014). <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0084-6>
- Cichoński, J., & Chrzanowski, G. (2022). Microalgae as a Source of Valuable Phenolic Compounds and Carotenoids. *Molecules*, 27(24), 8852. <https://doi.org/10.3390/molecules27248852>
- Coronado-Reyes, J. A., Salazar-Torres, J. A., Juárez-Campos, B., & González-Hernández, J. C. (2020). *Chlorella vulgaris*, a microalgae important to be used in Biotechnology: a review. *Food Science And Technology*, 42. <https://doi.org/10.1590/fst.37320>
- Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Marine Drugs*, 19(10), 549. <https://doi.org/10.3390/md19100549>

- Cudemos, E. (2017) *Evaluación del efecto de la densidad de población y la fase de crecimiento sobre la letalidad por pulsos de luz en microorganismos asociados a alimentos*. <http://hdl.handle.net/10872/16142>
- Cuello, M. C., Gori, J. I., Moheimani, N. R., & Chamorro, E. R. (2018). Producción de Compuestos Orgánicos de Valor Comercial a partir de la Biomasa Microalgal de *Scenedesmus Dimorphus*. *Revista Tecnología Y Ciencia*, (30), 281–289. Recuperado a partir de <https://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/169>
- Danet, A. (2021). Recent Advances in Antioxidant Capacity Assays. *Antioxidants [Working Title]*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.96654>.
- De los Ángeles, L., Guevara, M. Á., Gómez, B. J., Arredondo-Vega, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Producción de pigmentos procedentes de *Arthrospira maxima* cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 108-114. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.59671>
- De Romero López, T., & Lazo, H. E. (1998). *Concentración de clorofila total en el extrato etanólico, procedente de Chlorella sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera*. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/173>
- Duarte, P., & Rao, D. S. (2019). Photosynthesis—Energy Relationships in *Dunaliella*. En *CRC Press eBooks* (pp. 209-230). <https://doi.org/10.1201/9780429061639-9>
- El-Fayoumy, E. A., Shanab, S. M. M., Gaballa, H. S., Tantawy, M. A., & Shalaby, E. A. (2021). Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and different fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions. *BMC Complementary Medicine And Therapies*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03194-x>
- Ezeani, S. E., & Abu, G. O. (2019). Commercial Microalgae Culture in Inorganic Fertilizer Media. *Current Journal Of Applied Science And Technology*, 1-9. <https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v38i430372>
- Félix-Castro, M. B., Hernández-Uribe, F., Cota-Quintero, K. M., Galván-Álvarez, V. A., Rojas, M., Gómez-Anduro, G. A., & Arredondo-Vega, B. O. (2024). Microalgae and Cyanobacteria Antioxidant Capacity under Stress Conditions. En *Springer eBooks* (pp. 169-179). https://doi.org/10.1007/978-3-031-43969-8_14
- Ferdous, U., Nurdin, A., Ismail, S., & Yusof, Z. (2022). Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of crude extracts from marine *Chlorella sp.* *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102551. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102551>
- Fernandes, A. (2015). *Development of a biorefinery-based bioprocess for pigment and lipid production by oleaginous yeasts*. <https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/41463/1/Andreia%20Raue%20Gon%20a7alves%20Fernandes.pdf>
- Foyer, C. H., & Mullineaux, P. M. (2019). Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. En *CRC Press eBooks*. <https://doi.org/10.1201/9781351070454>

- García, I., Reyes, H., Echeverry, A., & Rodriguez, J. (2016). *Comparacion de la actividad antioxidante en tomate chonto y ahuyama por los metodos ABTS, DPPH y Voltamperometria cíclica/quantitative comparison of antioxidant activity in Chonto tomate and pumpkin by ABTS, DPPH and cyclic voltammetry methods. ProQuest.*
<https://www.proquest.com/openview/c334e208edde6549c1084ceb512ae09b/1?pq-origsite=gscholar&cbl=1806352>
- García-Barrientos, R., Minutti, L., & Juarez, E. (2025). Determinación de la actividad antioxidante por el método dpph y abts en hongos comestibles. Research gate.
https://www.researchgate.net/publication/389819909_Determinacion_de_la_actividad_antioxidante_por_el_metodo_dpph_y_abts_en_hongos_comestibles
- Gauthier, Senhorinho, G., & Scott, J. (2020). Microalgae under environmental stress as a source of antioxidants. *Algal Research*, 52, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102104>
- Goiris, K., Muylaert, K., Fraeye, I., Foubert, I., De Brabanter, J., & De Cooman, L. (2012). Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *Journal Of Applied Phycology*, 24(6), 1477-1486.
<https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gómez, F. J. S. (2015). *Aprovechamiento de residuos agro-industriales : preparación de extractos, caracterización y uso en alimentos.*
<https://doi.org/10.5821/dissertation-2117-96056>
- Gomez, L., Álvarez, I., & Rivero, R. (2011). *Cultivo de Chlorella vulgaris sobre residual de soja con la aplicación de un campo magnético.* http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-34752011000200003&script=sci_arttext
- Gómez-Luna, L, Tormos-Cedeño, L, & Ortega-Díaz, Y. (2022). Cultivo y aplicaciones de *Chlorella vulgaris*: principales tendencias y potencialidades en la agricultura. *Tecnología Química*, 42(1), 70-93. Epub 30 de abril de 2022. Recuperado en 25 de mayo de 2025, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852022000100070&lng=es&tlng=pt.
- Gopalakrishnan, K., Roostaei, J., & Zhang, Y. (2018). Mixed culture of *Chlorella* sp. and wastewater wild algae for enhanced biomass and lipid accumulation in artificial wastewater medium. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 12, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s11783-018-1075-2>.
- Guajardo, J. (2014). *Fórmula para cálculo de conteo celular en cámara de Neubauer.* IDOCPUB. <https://idoc.pub/documents/idocpub-2nv85jkkylk>
- Guillen, P. (2019). Chemical diversity of zoantharians from the coast of Ecuador in the tropical eastern pacific. Doi: 10.13140/RG.2.2.31411.66086.
- Gutierrez, M., Ortiz, C., & Cisneros A. (2008). Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. *Simposio de*

<https://mentor.cenam.mx/simposio2008/sm%5F2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf>

- Iovine, A., Cerbone, A., Mehariya, S., Musmarra, D., Casella, P., & Molino, A. (2019). Effect of Mechanical Pretreatment on Nannochloropsis Gaditiana on the Extraction of Omega-3 by Using Accelerated Extraction Solvent Technology. *DOAJ (DOAJ: Directory Of Open Access Journals)*. <https://doi.org/10.3303/cet1974158>
- Iradi, M. (2016). *Estudio de la actividad antioxidante de diversas plantas aromáticas y/o comestibles*. <https://doi.org/10.5821/dissertation-2117-105811>
- Jahnke, L. S., White, A. L., & Priya, S. (2019). The Effects of Ultraviolet Radiation on Dunaliella : Growth, Development and Metabolism. En *CRC Press eBooks* (pp. 231-272). <https://doi.org/10.1201/9780429061639-10>
- Kuo, C., Chen, T., Lin, T., Kao, C., Lai, J., Chang, J., & Lin, C. (2015). Cultivation of Chlorella sp. GD using piggyery wastewater for biomass and lipid production.. *Bioresource technology*, 194, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.07.026>.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science And Technology*, 25(4), 726-732. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612005000400016>
- Lathifah, W., Fikri, R. A., Hidayati, N. A., Anggraini, I. D., Putri, N., Prabowo, B., & Marno, S. (2021). Effect of commercial NPK fertilizer on growth and biomass of Navicula sp. and Nannochloropsis sp. *IOP Conference Series Earth And Environmental Science*, 762(1), 012060. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/762/1/012060>
- Leon, A. (2021). *Biotechnological and environmental applications of the microalga Chlorella sorokiniana* (Doctoral thesis). University of Huelva. Recuperado en 16 de mayo de 2025, de <http://hdl.handle.net/10272/19971>
- Li, H., Cheng, K., Wong, C., Fan, K., Chen, F., & Jiang, Y. (2006). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, 102(3), 771-776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- López, M. (2022) *Nanoformulados de extractos de Chlorella vulgaris en nanopartículas poliméricas para su aplicación agrícola en el control de Fusarium sp.* Maestría thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León. Recuperado en 20 de mayo de 2025, de <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/23422>
- Lugo, N. Z., León, M. T. C., Bañuelos, C. B., Rojas, T. R. V., Saldaña, H. L., & Damián, M. M. (2014). Total phenols and antioxidant capacity estimated with DPPH/ABTS assays in roses on preservative solutions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(6), 1029-1039.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342014000600010&lng=en

- Ma, X. (2012). *Biodiesel Production from Algae through In Situ Transesterification Technology*. <https://conservancy.umn.edu/handle/11299/143836>
- Manivannan, K., Anantharaman, P., & Balasubramanian, T. (2012). Evaluation of antioxidant properties of marine microalga *Chlorella marina* (Butcher, 1952). *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, 2(1), S342-S346. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(12\)60185-3](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(12)60185-3)
- Mardalisa, M., Zalfiatri, Y., & Rahmayuni, R. (2022). The Effect of Culture Media Types on the Growth of Marine Microalgae *Chlorella vulgaris*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1118. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1118/1/012029>.
- Mercado, I. & Alvarez, X. (2022) Biorrefinerías de microalgas: perspectivas en Ecuador. *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (CYTED)*, 7. https://www.researchgate.net/publication/374447026_Evaluacion_del_potencial_energetico_del_cambio_de_cultivo_de_Citrus_reticulata_var_Murcott_por_Citrus_unshiu_mandarina_satsuma
- Mesa-Vanegas, A., Gaviria, C., Cardona, F., Sáez-Vega, J., Blair, S., & Rojano, B. (2010). Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales de algunas especies del género *Calophyllum*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(2), 13-26. Recuperado en 01 de junio de 2025, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962010000200003&lng=es&tlng=es.
- Metin, U., & Altınbaş, M. (2024). Evaluating Ammonia Toxicity and Growth Kinetics of Four Different Microalgae Species. *Microorganisms*, 12(8), 1542. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12081542>
- Mtaki, K., Kyewalyanga, M. S., & Mtolera, M. S. P. (2020). Assessment of Antioxidant Contents and Free Radical-Scavenging Capacity of *Chlorella vulgaris* Cultivated in Low Cost Media. *Applied Sciences*, 10(23), 8611. <https://doi.org/10.3390/app10238611>
- 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>
- Munteanu, I., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.
- Naka, A., & Kurahashi, M. (2024). Impact of Salinity Fluctuations on *Dunaliella salina* Biomass Production. *Applied Biosciences*, 3(2), 213-219. <https://doi.org/10.3390/applbiosci3020014>

- Nascimento, T. C. D., Cazarin, C. B. B., Maróstica, M. R., Mercadante, A. Z., Jacob-Lopes, E., & Zepka, L. Q. (2019). Microalgae carotenoids intake: Influence on cholesterol levels, lipid peroxidation and antioxidant enzymes. *Food Research International*, 128, 108770. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108770>
- Ovando, A. V., Reyes, J. D. M., Cabrera, K. E. G., & Ovalle, G. V. (2022). *Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8739331>
- Ozgen, M., Reese, R., Tulio, A., Scheerens, J., & Miller, A. (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (abts) method to measure antioxidant capacity of Selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods.. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 4, 1151-7 . <https://doi.org/10.1021/JF051960D>.
- Paterson, S., Majchrzak, M., Alexandru, D., Di Bella, S., Fernández-Tomé, S., Arranz, E., De la Fuente, M. A., Gómez-Cortés, P., & Hernández-Ledesma, B. (2024). Impact of the biomass pretreatment and simulated gastrointestinal digestion on the digestibility and antioxidant activity of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Tetraselmis chuii*. *Food Chemistry*, 453, 139686. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139686>
- Peñuela, M. M., Ramírez, J., Paternina, A. M. O., Robles, V. M. M., Casallas, P. E. C., & Santamaría, Y. V. (2012). *Effect of culture medium on growth and protein content of Chlorella vulgaris*. Dialnet. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5687256>
- Pila, A. N., Cuello, M. C., Schmitd, R. M., & Chamorro, E. (2022). Microalgae lipid extraction: a novel lab-scale method within a biorefinery approach (fractioning). *Revista Tecnología y Ciencia*, 45, 31-45. <https://doi.org/10.33414/rtyc.45.31-45.2022>
- Pradhan, B., Baral, S., Patra, S., Behera, C., Nayak, R., MubarakAli, D., & Jena, M. (2020). Delineation of gamma irradiation (60Co) induced oxidative stress by decrypting antioxidants and biochemical responses of microalga, *Chlorella sp.*. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 25, 101595. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101595>.
- Pradhan, B., Baral, S., Patra, S., Behera, C., Nayak, R., MubarakAli, D., & Jena, M. (2020). Delineation of gamma irradiation (60Co) induced oxidative stress by decrypting antioxidants and biochemical responses of microalga, *Chlorella sp.*. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 25, 101595. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101595>
- Rendón-Castrillón, L., Ramírez-Carmona, M., Ocampo-López, C., & Giraldo-Aristizabal, R. (2020). Evaluation of the operational conditions in the production and

- morphology of *Chlorella sp.* *Brazilian Journal Of Biology*, 81(1), 202-209. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228874>
- Reyes, T. H., Chiellini, C., Barozzi, E., Sandoval, C., Echeverría, C., & Guglielminetti, L. (2023). Exploring the Physiological Multiplicity of Native Microalgae from the Ecuadorian Highland, Italian Lowland and Indoor Locations in Response to UV-B. *International Journal Of Molecular Sciences*, 24(2), 1346. <https://doi.org/10.3390/ijms24021346>
- Rodríguez, E. (2021). *Modelo matemático de crecimiento celular que describe la dinámica de microorganismos durante la fermentación.* <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/5880>
- Rofidi, I. (2017). Commercial Fertilizer as Cheaper Alternative Culture Medium for Microalgal Growth (*Chlorella sp.*). Research gate. https://www.researchgate.net/publication/318201032_Commercial_Fertilizer_as_Cheaper_Alternative_Culture_Medium_for_Microalgal_Growth_Chlorella_sp
- Romero, L., Guevara, M., D'armas, H., & Lodeiros, C. (2008). Cuantificación de carotenos totales y β -caroteno en dos cepas de *Dunaliella salina* (Chlorophyta, Volvocales) aisladas de lagunas hipersalinas de Venezuela. 47. 67-76. Research gate. https://www.researchgate.net/publication/361177557_Cuantificacion_de_carotenoides_totales_y_bcaroteno_en_dos_cepas_de_Dunaliella_salina_chlorophyta_volvocales_aisladas_de_lagunas_hipersalinas_de_Venezuela
- Routray, W., Vasudevan, V., & Dave, D. (2017). An Overview of Bioprocessing and Biorefinery Approach for Sustainable Fisheries. 10.1201/9781315365978-13.
- Rubio, D., Barrera, N., Fonseca, L. & Jaimes, C. (2017) Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Semilleros: Formación Investigativa*. 3(1), 35-48 Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11839/6436>
- Ruiz-Marin, A., Canedo-Lopez, Y., Campos-Garcia, S., Sabido-Perez, M., & Zavala-Loria, J. (2013). Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge coimmobilized with *Scenedesmus obliquus*. *Agrociencia*, 47(5), 429-441. Recuperado en 01 de junio de 2025, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000500002&lng=es&tlng=.
- Sadek, N., Gebreel, M., Abd El Fatah, M., Moussa, A., & Zakaria E. (2025). Impact of Stress-Induced Shocks on Carotenoids and Phenolics Production from *Chlorella vulgaris* and *Anabaena torulosa*. *Egyptian Journal Of Aquatic Biology And Fisheries*, 29(2), 1823-1847. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2025.421340>
- Sandoval, J., Naranjo, K., Casas, L. (2023). Producción de protector solar a partir de *Chlorella vulgaris*. *Ingeniería e innovación*. Recuperado en 20 de mayo de 2025, de DOI:[10.21897/rii.3338](https://doi.org/10.21897/rii.3338)
- Sari, L., Melva, E., Aldilameta, S., Istiqomah, N., Dewi, N., Arsad, S., & Omar, W. (2025). Oxidation Stress of UV C Light on Growth, Carotenoids and Chlorophyll-

- a Content of *Chlorella vulgaris*. *HAYATI Journal of Biosciences*. <https://doi.org/10.4308/hjb.32.3.819-828>.
- Satriaji, D. E., Zainuri, M., & Widowati, I. (2016). Study of growth and N, P content of microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in different culture media and light intensity. *Jurnal Teknologi*, 78(4-2). <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8148>
- Silva, A. & Graciano, G. (2018). *Screening of an adapted culture medium composed by different carbon sources for heterotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using microplate assay*. *ResearchGate*. DOI: [10.4025/actascibiolsci.v40i1.39401](https://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v40i1.39401)
- Soteldo, L., Alvis, A., & Arrazola G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124. <https://doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>
- Tovar, J. (2013). *determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion Cafétera*. Repositorio de la Universidad Tecnológica de Pereira. <https://hdl.handle.net/11059/3636>
- Tran, T., Le, T. D., Vo, T., & Bui, X. (2023). Exploring the combined effects of bicarbonate, NPK fertilizers, and salinity on *Chlorella vulgaris* growth. *Systems Microbiology And Biomanufacturing*, 4(2), 766-782. <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00203-1>
- Verma, M., & Mishra, V. (2022). Influence of Culture Conditions on the Microalgal Biomass and Lipid Accumulation. En *Clean Energy Production Technologies* (pp. 149-
- Vignaud, J., Loiseau, C., Hérault, J., Mayer, C., Côme, M., Martin, I., & Ulmann, L. (2023). Microalgae Produce Antioxidant Molecules with Potential Preventive Effects on Mitochondrial Functions and Skeletal Muscular Oxidative Stress. *Antioxidants*, 12(5), 1050. <https://doi.org/10.3390/antiox12051050>
- Wang, C., Onyeaka, H., Miri, T., & Soltani, F. (2024). *Chlorella vulgaris* as a food substitute: Applications and benefits in the food industry. *Journal Of Food Science*. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17529>
- Wołosiak, R., Drużyńska, B., Derewiaka, D., Piecyk, M., Majewska, E., Ciecierska, M., Worobiej, E., & Pakosz, P. (2021). Verification of the Conditions for Determination of Antioxidant Activity by ABTS and DPPH Assays—A Practical Approach. *Molecules*, 27. <https://doi.org/10.3390/molecules27010050>.
- Yahia, E., Soto-Zamora, G., Brecht, J., & Gardea, A. (2007). Postharvest hot air treatment effects on the antioxidant system in stored mature-green tomatoes. *Postharvest Biology and Technology*, 44, 107-115. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2006.11.017>.
- Young, A. J. (1993). Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae. En *Springer eBooks* (pp. 160-205). https://doi.org/10.1007/978-94-011-2124-8_6

- Yu, M., Chen, M., Gui, J., Huang, S., Liu, Y., Shentu, H., He, J., Fang, Z., Wang, W., & Zhang, Y. (2019). Preparation of *Chlorella vulgaris* polysaccharides and their antioxidant activity in vitro and in vivo. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 137, 139-150. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.222>
- Zakaria, S. M., Kamal, S. M. M., Harun, M. R., Omar, R., & Siajam, S. I. (2017). Subcritical Water Technology for Extraction of Phenolic Compounds from *Chlorella sp.* Microalgae and Assessment on Its Antioxidant Activity. *Molecules*, 22(7), 1105. <https://doi.org/10.3390/molecules22071105>

ANEXOS



Anexo 1.

Conteo en cámara de Neubauer



Anexo 2.

Extracción de carotenos protegiendo los pigmentos



Anexo 3.

Lectura de carotenos.



Anexo 4.

Materiales para la evaluación antioxidante



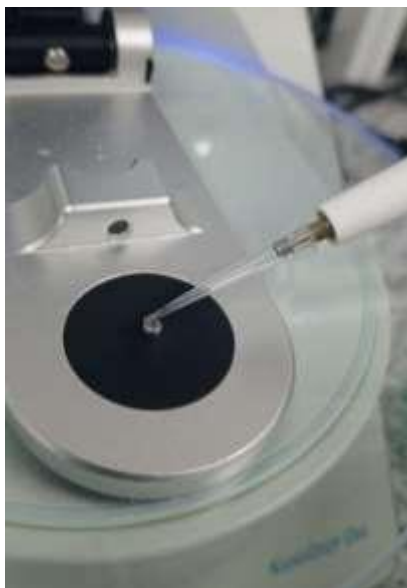
Anexo 5.

Preparación de muestra para la lectura



Anexo 6.

*Reactivo DPPH con el extracto de *Chlorella spp.**



Anexo 7.

Colocación de muestra en espectrofotómetro Nanodrop



Anexo 8.

Lectura en Nanodrop

Día	Células
0	7,25E+04
1	1,02E+05
2	2,09E+05
3	3,24E+05
4	1,96E+06
5	2,59E+06
6	3,30E+06
7	4,17E+06
8	4,76E+06
9	5,16E+06
10	5,34E+06
11	5,34E+06
12	5,34E+06
13	5,33E+06

Anexo 9.

Datos del conteo celular en el medio de cultivo NPK.

Muestras	664	647	480
MV1	0,809	0,374	0,590
MV2	0,762	0,358	0,562
MV3	0,645	0,294	0,464
M10D1	0,35	0,105	0,206
M10D2	0,351	0,127	0,278
M10D3	0,425	0,135	0,216
M20D1	0,084	0,041	0,124
M20D2	0,086	0,044	0,124
M20D3	0,092	0,049	0,136

Anexo 10.

Absorbancias obtenidas durante la extracción de carotenos.

Muestra	Ca (mg/L)	Cb (mg/L)	Cx+b (mg/L)	β (mg/L)	Promedio Ca	Promedio Cb	Promedio Cx+b	Promedio β
MV1	8,93	3,13	12,06	2,36	8.15 ±	2.87 ±	11.02 ±	2.15 ±
MV2	8,40	3,07	11,47	2,248	0.93	0.40	1.32	0.26
MV3	7,13	2,41	9,54	1,856				
M10D1	1,63	0,20	1,83	0,824	1.80 ±	0.41 ±	2.21 ±	0.93 ±
M10D2	2,06	0,64	2,70	1,112	0.23	0.22	0.45	0.16
M10D3	1,71	0,39	2,10	0,864				
M20D1	0,92	0,37	1,29	0,496	0.95 ±	0.43 ±	1.38 ±	0.51 ±
M20D2	0,94	0,42	1,36	0,496	0.04	0.06	0.10	0.03
M20D3	1,00	0,49	1,49	0,544				

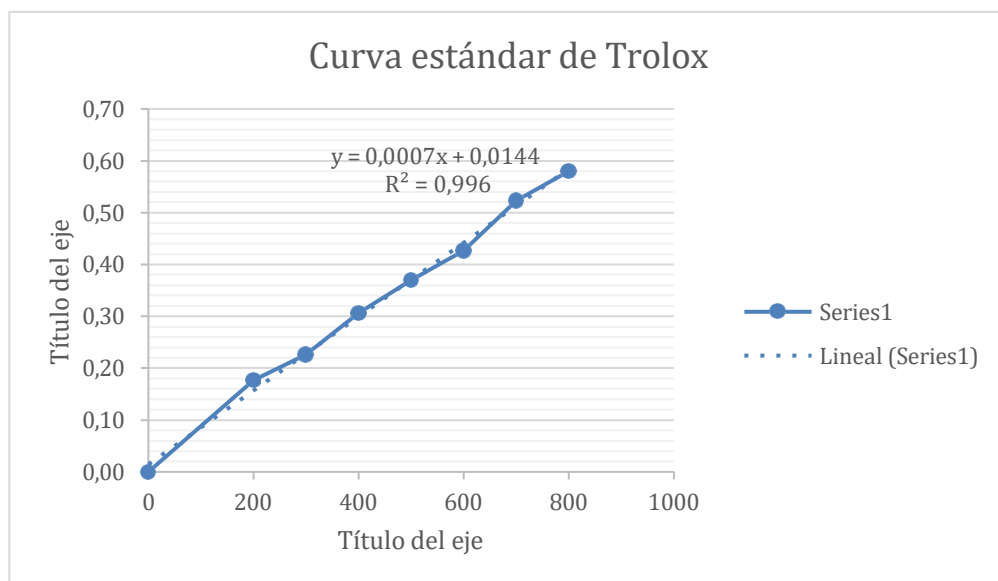
Anexo 11.

Valores de Clorofilas totales y carotenos, por muestra.

Concentración (µmol/l)	Absorbancia $\lambda=515\text{nm}$				
	R1	R2	R3	Promedio	Abs. Neta
0	0,85	0,87	0,87	0,86	0,00
200	0,69	0,70	0,67	0,69	0,18
300	0,64	0,63	0,64	0,64	0,23
400	0,52	0,57	0,58	0,56	0,31
500	0,48	0,5	0,5	0,49	0,37
600	0,43	0,43	0,45	0,44	0,43
700	0,35	0,35	0,32	0,34	0,52
800	0,28	0,28	0,29	0,28	0,58

Anexo 12.

Registro de valores para realizar la curva de calibración



Anexo 13.

Curva de calibración para capacidad antioxidante.

Muestra	Abs	Abs neta	Conc. (µmol/l)	Volumen de aforo (L)	Peso muestras (g)	FD	µmol Eq trolox/g	Promedio	SD	Total
MV	0,76	0,10	124,72	0,01	0,1203	1	10,37	9,98	0,67	9,98±0,67
	0,77	0,09	110,69	0,01	0,1203	1	9,20			
	0,76	0,10	124,72	0,01	0,1203	1	10,37			
M10D	0,64	0,22	293,10	0,01	0,1203	1	24,36	23,20	1,17	23,20±1,17
	0,65	0,21	279,06	0,01	0,1203	1	23,20			
	0,66	0,20	265,03	0,01	0,1203	1	22,03			
M20D	0,74	0,12	152,78	0,01	0,1207	1	12,66	11,88	0,67	11,88±0,67
	0,75	0,11	138,75	0,01	0,1207	1	11,50			
	0,75	0,11	138,75	0,01	0,1207	1	11,50			

Anexo 14.

Capacidad antioxidante del primer extracto.

Muestra	Abs	Abs neta	Conc. ($\mu\text{mol/l}$)	Volumen de aforo (L)	Peso muestras (g)	FD	$\mu\text{mol Eq trolox/g muestra}$	Promedio	SD	Total
MV	0,67	0,19	251,00	0,005	0,0157	1	79,94	76,96	5,16	76,95 \pm 5,16
	0,67	0,19	251,00	0,005	0,0157	1	79,94			
	0,69	0,17	222,94	0,005	0,0157	1	71,00			
M10D	0,67	0,19	251,00	0,005	0,0150	1	83,67	85,23	2,70	85,23 \pm 2,70
	0,66	0,20	265,03	0,005	0,0150	1	88,34			
	0,67	0,19	251,00	0,005	0,0150	1	83,67			
M20D	0,73	0,13	166,82	0,005	0,0153	1	54,51	56,04	2,65	56,04 \pm 2,65
	0,73	0,13	166,82	0,005	0,0153	1	54,51			
	0,72	0,14	180,85	0,005	0,0153	1	59,10			

Anexo 15.

Capacidad antioxidante del segundo extracto.

Shapiro-Wilk	
Carotenos	
W = 0,83646	p-value = 0,05274
Antioxidante E1	
W = 0,77367	p-value = 0,01018
Antioxidante E2	
W = 0,85523	p-value = 0,08506

Anexo 16.

Análisis estadístico Shapiro-Wilk

Kruskal-Wallis			
chi-squared = 7,2605	df = 2	p-value = 0,02651	
Comparison	Z	P. uniaj	P. adj
M10D - M20D	1,347	0,178	0,5336836
M10D - MV	-1,347	0,178	0,5336836
M20D - MV	-2,695	0,007	0,02114625

Anexo 17.

Análisis estadístico Kruskal-Wallis para carotenos.

Kruskal-Wallis			
chi-squared = 7,322	df = 2	p-value = 0,02571	
Comparison	Z	P. uniaj	P. adj
M10D- M20D	1,353	0,176	0,528
M10D-MV	2,706	0,007	0,02
M20D - MV	1,353	0,176	0,528

Anexo 18.

Análisis estadístico Kruskal-Wallis para el primer extracto

Kruskal-Wallis			
chi-squared = 7,3846	df = 2	p-value = 0,02491	
Comparison	Z	P. uniaj	P. adj
M10D- M20D	2,717	0,007	0,02
M10D- MV	1,359	0,174	0,523
M20D - MV	-1,359	0,174	0,523

Anexo 19.

Análisis estadístico Kruskal-Wallis para el segundo extracto

Carotenos vs Antioxidante E1		
S = 181,27	p-value = 0,1602	rho= -0,5105531

Anexo 20.

Correlación de Spearman entre Carotenos y el primer extracto.

Carotenos vs Antioxidante E2		
S = 58,981	p-value = 0,1622	rho= 0.5084928

Anexo 21.

Correlación de Spearman entre carotenos y el segundo extracto.

 UEB UNIVERSIDAD ESTADAL DE BOLÍVAR	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Laguacolo 9, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>		Código	IR-AA
		INFORME DE RESULTADOS		Versión	1
				Año	2025
				Página	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYOS N° 144

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA					
Solicitante:	Santiago David Yugcha Lapo				
Muestra:	Muestra de Chlorella vegetativa, muestra de Chlorella estrezada 10 días, muestra de Chlorella estrezada 20 días				
Código asignado UEB:	INV 258, INV 259, INV 260				
Estado de la muestra:	Sólida				
Envase de recepción:	Tubo plástico de 1.5 ml con 500 mg aprox. de contenido de muestra				
Análisis requerido(s):	Actividad Antioxidante				
Fecha de recepción:	21 de abril de 2025				
Fecha de análisis:	21 al 23 de abril de 2025				
Fecha de informe:	24 de abril de 2025				
Técnico (s) asignado:	MFQM				
RESULTADOS OBTENIDOS					
Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado
INV 258	Muestra de Chlorella vegetativa. E1	Actividad antioxidante	DPPH ((2,2-Difenil-1-Picnildrazilo)	µmol ET/g muestra	9,98
INV 259	Muestra de Chlorella estrezada 10 días. E1				23,20
INV 260	Muestra de Chlorella estrezada 20 días. E1				11,88
INV 258	Muestra de Chlorella vegetativa. E2				76,96
INV 259	Muestra de Chlorella estrezada 10 días. E2				85,23
INV 260	Muestra de Chlorella estrezada 20 días. E2				56,04

Los resultados de los análisis corresponden a 3 determinaciones por muestra.



Ing. Favian Bayas PhD.
 Director DIVIUEB

Anexo 22.

Informe de la capacidad antioxidante de Chlorella spp. realizado en la UEB.