



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

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE  
*Dunaliella sp.* ESTRESADA POR ALTA INTENSIDAD  
LUMÍNICA Y TEMPERATURA.**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR  
Previo a la obtención del Título de  
BIÓLOGO**

**AUTOR:**

**Patiño Rodríguez Manuel Alejandro**

**TUTOR:**

**Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.**

**SANTA ELENA - ECUADOR**

**2026**

**UNIVERSIDAD ESTATAL PENINSULA DE SANTA ELENA  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR CARRERA DE  
BIOLOGÍA**

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE  
*Dunaliella sp.* ESTRESADA POR ALTA INTENSIDAD  
LUMÍNICA Y TEMPERATURA”**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Previa a la obtención del Título de:**

**BIÓLOGO**

**AUTOR:**

**Patiño Rodríguez Manuel Alejandro**

**TUTOR:**

**Ing. Jimmy Villón Moreno, MSc.**

**LA LIBERTAD - ECUADOR**

**2026**

# DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, "Evaluación de la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.* estresada por alta intensidad lumínica y temperatura", elaborado por Patiño Rodríguez Manuel Alejandro estudiantes 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/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



---

**Ing. Villon Moreno Jimmy Agustín**

**DOCENTE TUTOR**

**C.I. 0913270153**

## **DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA**

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular “**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE *Dunaliella sp.* ESTRESADA POR ALTA INTENSIDAD LUMÍNICA Y TEMPERATURA**”, elaborado por Patiño Rodríguez Manuel Alejandro, 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. Julia Elizabeth Vélez Moreira, Mgt.**  
**DOCENTE DE ÁREA**  
**C.I. 1312308925**

# DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y fortaleza durante toda mi etapa académica, por brindarme de su sabiduría para enfrentar cada desafío en el camino.

A mis padres, Rosa Amelia Rodriguez y Manuel Antonio Patiño, mi pilar fundamental. Este logro es el resultado directo de su esfuerzo incansable, su apoyo incondicional y su amor infinito. Sin sus sacrificios y su confianza en mí, esta meta no habría sido posible. Estoy profunda y eternamente agradecido.

Los quiero mucho. A mi querida hermana María José, por brindarme siempre su ayuda y estar presente cuando más lo necesité.

A Santiago y a mi tía Amelia, por su apoyo sincero y cariño y siempre poder contar con ellos.

A mi buen amigo Paolo Vera, por acompañarme en este camino, por los consejos y por ofrecerme su ayuda cada vez que la necesité, también a mi amigo Soriano Cancio por apoyarme durante toda la carrera.

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

A la Blga. Emely Tomala; Gracias por ser mi compañera incondicional, por tu paciencia y por tu invaluable ayuda en la realización de este trabajo. Tu apoyo fue mi ancla en los momentos de estrés y tu presencia constante me motivó a seguir adelante. Eres parte esencial de este éxito.

A todos ustedes, les dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTO**

A las autoridades y al personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena, por su liderazgo en el proceso de formación profesional y por fomentar una educación basada en la excelencia.

Mi más sincero agradecimiento al Ing. Jimmy Villón, tutor de este trabajo, por su constante guía, y valioso acompañamiento durante el desarrollo de la investigación. Sus orientaciones técnicas, sugerencias y consejos fueron fundamentales para fortalecer la calidad de este estudio.

A la Dra. Janeth Galarza, por su apoyo, sus aportes académicos y por compartir sus conocimientos con generosidad, contribuyendo significativamente al desarrollo del tema investigado.

A la Blga. Dennis Tomalá, por su colaboración cada vez que requerí su ayuda, demostrando siempre disposición y compromiso con el avance del trabajo.

Expreso también mi agradecimiento al Laboratorio de Investigación y Vinculación, por facilitar los recursos y el espacio necesarios para llevar a cabo las actividades experimentales. A la Ing. María Fernanda Quinteros, por su colaboración durante los análisis y por brindarme su apoyo técnico y humano en todo momento.

A la Blga. Laura Reyes, por su valiosa ayuda en la fase experimental y en el manejo de los cultivos, así como por su constante disposición para orientar y colaborar en el trabajo de laboratorio. Extiendo igualmente mi gratitud a mis compañeros de laboratorio y de clase, por su apoyo, compañerismo y por compartir conmigo experiencias y aprendizajes que enriquecieron esta etapa académica. A todos, gracias por formar parte de este logro y por contribuir, de una u otra manera, al cumplimiento de este objetivo profesional.

# TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Patino Rodriguez Manuel Alejandro** 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: 12/12/2025



---

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



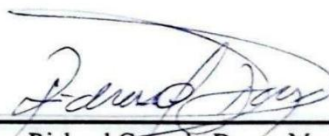
---

Blga. Julia Elizabeth Vélez Moreira, Mgt.  
**PROFESOR DE ÁREA**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

Ing. Jimmy Villón Moreno, M.Sc.  
**DOCENTE TUTOR**  
**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**



---

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



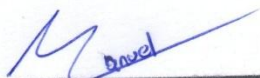
---

Lcdo. Pascual Alejandro Roca Silvestre, M.Sc.  
**SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL**

## **Declaración expresa**

Yo, Patiño Rodríguez Manuel Alejandro, declaro que los datos, ideas y análisis de resultados expuestos en este trabajo de integración curricular son originales y de mi autoría. El patrimonio intelectual del presente trabajo pertenece a la Universidad Estatal Península de Santa Elena, conforme al reglamento institucional.

Atentamente,



**Patiño Rodríguez Manuel Alejandro**

**Estudiante**

**C.I. 2450773524**

## ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	XVIII
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. PROBLEMÁTICA.....	4
4. JUSTIFICACIÓN .....	6
5. OBJETIVOS .....	8
5.1. Objetivo general.....	8
5.2. Objetivos específicos.....	8
6. Hipótesis .....	9
CAPÍTULO II.....	10
7. MARCO TEÓRICO.....	10
7.1. Microalgas como recurso biotecnológico.....	10
7.2. Características generales del género <i>Dunaliella</i> .....	12
7.3. Clasificación taxonómica de <i>Dunaliella</i> .....	14
7.4. Distribución y hábitats.....	15
7.5. Carotenoides en microalgas .....	16
7.6. Métodos de extracción y cuantificación .....	17
7.7. Estrés abiótico en microalgas .....	19
7.7.1. Efecto de la alta intensidad lumínica.....	19
7.7.2. Efecto de la temperatura.....	20

7.8. Antecedentes y estudios previos.....	20
<b>CAPÍTULO III:.....</b>	<b>24</b>
<b>8. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>24</b>
8.1. Tipo de investigación.....	24
8.2. Origen de la cepa de <i>Dunaliella sp.</i> .....	24
8.3. Medios de cultivo y pruebas de crecimiento vegetativo.....	25
8.3.1. Preparación del medio Guillard F/2:.....	25
8.3.2. Mantenimiento de cepas.....	26
8.3.3. Cultivos vegetativos.....	27
8.4. Inducción a estrés.....	29
8.5 Cinética de crecimiento microalgal en <i>Dunaliella sp.</i> .....	32
8.5.1. Tasa de crecimiento específica.....	32
8.5.2 Tasa de duplicación.....	32
8.5.3. Productividad celular.....	33
8.6. Obtención de biomasa para análisis bioquímicos. ....	33
8.6.1. Cosecha de biomasa.....	33
8.6.2. Secado de biomasa.....	34
8.7. Análisis bioquímicos: carotenos totales y antioxidantes.....	35
8.7.1. Carotenoides totales.....	35

8.7.2. Análisis de capacidad antioxidante .....	37
8.8. Análisis estadísticos .....	42
<b>CAPÍTULO IV: .....</b>	<b>43</b>
<b>9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
9.1 Crecimiento celular y producción de carotenoides totales en <i>Dunaliella sp.</i> .....	43
9.1.1. Determinación de la curva de crecimiento.....	43
9.1.2. Crecimiento celular durante la fase experimental.....	44
9.1.3 Producción de pigmentos fotosintéticos en <i>Dunaliella sp.</i> bajo condiciones estresantes .....	45
9.2 Capacidad antioxidante de <i>Dunaliella sp.</i> bajo condiciones estresantes. ....	50
9.2.1 Correlación de Pearson de carotenoides totales con capacidad antioxidante .....	52
9.3. Comparación de la capacidad antioxidante con otras muestras. ....	53
<b>10. DISCUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>11. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>12. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>13. BIBLIOGRAFÍAS.....</b>	<b>65</b>
<b>14. ANEXOS .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Uso biotecnológico de las microalgas .....	11
Figura 2. Morfología celular de <i>Dunaliella sp.</i> bajo microscopía óptica.....	13
Figura 3. Great Salt Lake con variaciones de coloración asociados a floraciones de <i>Dunaliella</i> .....	15
Figura 4. Estructuras químicas de los carotenoides $\beta$ - caroteno y astaxantina. ...	16
Figura 5. Esquema del proceso de cultivo de <i>Dunaliella sp.</i> .....	29
Figura 6. Diseño experimental de la fase de estrés .....	31
Figura 7. Cosecha de biomasa estresada obtenida de cada grupo inducido a estrés .....	34
Figura 8. Proceso de secado de la biomasa de <i>Dunaliella sp.</i> .....	35
Figura 9. Cuantificación de carotenoides totales por espectrofotómetro. ....	37
Figura 10. Metodología para extracción y cuantificación de capacidad antioxidante. ....	41
Figura 11. Cinética de crecimiento de <i>Dunaliella sp.</i> .....	44
Figura 11. Concentración de clorofila $\alpha$ en <i>Dunaliella sp.</i> .....	46
Figura 12. Concentración de clorofila $\beta$ en <i>Dunaliella sp.</i> .....	47
Figura 13. Concentración de carotenos totales en <i>Dunaliella sp.</i> .....	48
Figura 14. Capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol Eq Trolox/g muestra}$ ).....	52
Figura 15. Correlación entre carotenoides totales y capacidad antioxidante. ....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Soluciones químicas del Medio de cultivo Guillard F/2 .....	25
Tabla 2. Parámetros cinéticos del crecimiento microalgal durante la fase de estrés. .....	45
Tabla 3. Promedios de cantidad de clorofila $\alpha$ , $\beta$ y carotenoides totales de <i>Dunaliella sp.</i> sometida a distintos tratamientos de estrés.....	49
Tabla 4. Promedios de parámetros espectrofotométricos y capacidad antioxidante de <i>Dunaliella sp.</i> sometida a distintos tratamientos de estrés.....	51
Tabla 5. Capacidad antioxidante de <i>Dunaliella sp.</i> en distintos contextos experimentales y estudios previos.....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Celulas de Dunaliella sp. vistas en un microscopio a 40x.....	77
Anexo 2. Escalamiento a cultivos en 3 litros. ....	77
Anexo 3. Cultivos de 150 mL utilizados en la curva de crecimineto.....	78
Anexo 4. Toma de intensidad luminica durante la fase de estrés.....	78
Anexo 5. Celulas de Dunaliella sp. pertenecientes al Grupo 1. ....	79
Anexo 6. Biomasa seca de cultivo perteneciente al control.....	79
Anexo 7. Biomasa residual de la extracción de carotenoides. ....	80
Anexo 8. Extracto de la Capacidad antioxidante de las muestras de Dunaliella sp. .....	80
Anexo 9. Solución Stock del Reactivo DPPH. ....	81
Anexo 10. Puntos para realizar la Curva estandar de Trolox.....	81
Anexo 11. Datos de carotenoides totales. ....	82
Anexo 12. Datos de lectura de cada punto de la Curva estandar de Trolox.....	85
Anexo 13. Curva estandar de Trolox.....	85
Anexo 14. Capacidad antioxidante de cada muestra.....	86
Anexo 15. Informe de la capacidad antioxidante de Dunaliella sp. realizado en la UEB.....	87
Anexo 16. Prueba Kruskal-Wallis para clorofila $\alpha$ . ....	88
Anexo 17. Prueba Kruskal-Wallis para Clorofila $\beta$ .....	88

Anexo 18. Prueba Kruskal-Wallis de carotenoides totales. ....	89
Anexo 19. Prueba Post-Hoc Dunn´s de carotenoides totales. ....	89
Anexo 20. Anova de una via para capacidad antioxidante.....	89
Anexo 21. Prueba POST-HOC Tukey HSD.....	90

## GLOSARIO

**Antioxidante:** Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación (daño celular) causada por radicales libres.

**Carotenogénesis:** Proceso biológico de biosíntesis de pigmentos carotenoides, frecuentemente inducido en microalgas como *Dunaliella* por factores de estrés (luz, salinidad, temperatura).

**Especies Reactivas de Oxígeno (ROS):** Moléculas altamente reactivas (como el oxígeno singlete) generadas durante procesos metabólicos y bajo estrés ambiental, que pueden causar daño oxidativo a la célula.

**Estrés Oxidativo:** Desequilibrio celular provocado por un exceso de ROS que supera la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante del organismo.

**Irradiancia:** Medida de la intensidad lumínica o densidad de flujo de fotones que incide sobre una superficie, comúnmente expresada en  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

**Trolox:** Compuesto análogo sintético de la vitamina E, utilizado como estándar de referencia para cuantificar la capacidad antioxidante en ensayos como el DPPH.

## ABREVIATURAS

**C:** Grupo control

**G1:** Tratamiento con alta iluminación

**G2:** Tratamiento térmico

**G3:** Estrés combinado

**GV:** Grupo vegetativo

**ROS:** Especies reactivas de oxígeno.

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (reactivo para capacidad antioxidante).

**TE:** Equivalentes de Trolox.

**Abs:** Absorbancia medida por espectrofotometría.

**C $\alpha$ :** Concentración de clorofila a

**C $\beta$ :** Concentración de clorofila b

**C(x+c):** Carotenoides totales estimados por espectrofotometría.

**$\mu$ e:** Tasa de crecimiento específica ( $\text{día}^{-1}$ ).

**Td:** Tiempo de duplicación celular.

**PB:** Productividad de biomasa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ ).

**DC:** Densidad celular ( $\text{cel}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

**$\mu$ g:** microgramo

**mL:** mililitro

**$\mu$ Mol:** micromoles

**g:** gramos

**$\mu$ l:** microlitro

**L:** litros

**mg:** miligramo

## 1. RESUMEN

Las microalgas pertenecientes al género *Dunaliella* se destacan como una fuente prometedora de compuestos antioxidantes de utilidad biotecnológica. Aunque abundan estudios relacionados sobre estrés en este género de microalgas el más utilizado es el estrés salino hay una deficiencia respecto al efecto combinado de alta iluminación y temperatura sobre su capacidad antioxidante. Debido a ello el objetivo del estudio fue evaluar la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.* sometida a alta luminosidad y temperatura. Para conseguirlo se diseñó un experimento con un grupo control (23°C y 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), un grupo con alta intensidad lumínica (G1: 700  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), otro con alta temperatura (G2: 28-32°C), un grupo con estrés combinado (G3: 700  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  + 28 °C) y además un grupo con células jóvenes que sería el Vegetativo. La cuantificación de carotenoides totales se realizó mediante espectrofotometría y la capacidad antioxidante se determinó utilizando el método DPPH; donde se utilizó como estándar el Trolox. Los resultados arrojaron que la clorofila  $\alpha$  y  $\beta$  fueron mayores en control (17,19 $\pm$ 0,56 y 9,63 $\pm$ 0,92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) además de que disminuyó en los grupos con alta intensidad luminosa; por otro lado, los carotenoides totales aumentaron en los grupos estresados, donde destacó el G3 con 5,91 $\pm$ 0,289  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Del mismo modo la capacidad antioxidante fue mayor en el G3 con 176,46 $\pm$ 1,92  $\mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g}$ , además se pudo observar que existe una correlación fuerte positiva entre la cantidad de carotenoides totales y la capacidad antioxidante. Se concluye que el utilizar una combinación de estresores provoca un efecto sinérgico lo que potencia la biosíntesis de compuestos antioxidantes en *Dunaliella sp.*, confirmando su potencial para la obtención de estos metabolitos.

**Palabras claves:** *Dunaliella sp.*, capacidad antioxidante, carotenoides, estrés abiótico, DPPH.

## ABSTRACT

Microalgae belonging to the genus *Dunaliella* stands out as a promising source of antioxidant compounds with biotechnological applications. Although there are many studies related to stress in this genus of microalgae, the most used is salt stress, and there is a lack of research on the combined effect of high light and temperature on their antioxidant capacity. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of *Dunaliella sp.* subjected to high light and temperature. To achieve this, an experiment was designed with a control group (23°C and 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a group with high light intensity (G1: 700  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), another with high temperature (G2: 28-32°C), a group with combined stress (G3: 700  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ + 28 °C), and a group with young cells, which would be the vegetative group. The quantification of total carotenoids was performed by spectrophotometry, and the antioxidant capacity was determined using the DPPH method, with Trolox used as the standard. The results showed that chlorophyll  $\alpha$  and  $\beta$  were higher in the control group (17.19 $\pm$ 0.56 and 9.63 $\pm$ 0.92  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and decreased in the groups with high light intensity. On the other hand, total carotenoids increased in the stressed groups, with G3 standing out with 5.91 $\pm$ 0.289  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Similarly, antioxidant capacity was higher in G3 with 176.46 $\pm$ 1.92  $\mu\text{mol Eq Trolox}/\text{g}$ . In addition, a strong positive correlation was observed between the number of total carotenoids and antioxidant capacity. It is concluded that using a combination of stressors causes a synergistic effect that enhances the biosynthesis of antioxidant compounds in *Dunaliella sp.*, confirming its potential for obtaining these metabolites.

**Keywords:** *Dunaliella sp.*, antioxidant capacity, carotenoids, abiotic stress, DPPH

## 2. INTRODUCCIÓN

Las microalgas han revelado su gran potencial como fuente de compuestos con propiedades antioxidantes, fotoprotectoras y nutricionales (Odenthal et al., 2024). Entre ellas destaca el género *Dunaliella*, caracterizado por su alta tolerancia a condiciones ambientales extremas como elevada salinidad, intensidad lumínica y temperatura, mismas que inducen procesos de estrés oxidativo y a su vez promueven la síntesis de metabolitos secundarios de interés comercial, como los carotenoides (Pourkarimi, Hallajisani, Alizadehdakhel, Nouralishahi, & Golzary., 2020); (Hotos, 2023).

La exposición a estrés ambiental, en particular, alta intensidad lumínica y temperatura incrementa la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden causar daños severos a los componentes fotosintéticos de la célula (Foyer & Shigeru Shigeoka, 2010). Sin embargo, *Dunaliella* ha desarrollado mecanismos adaptativos como la osmorregulación y la sobreproducción de compuestos antioxidantes que le permitan contrarrestar el efecto negativo de este proceso (Zhao et al., 2024).

Para aprovechar dicha característica adaptativa, en trabajos previos se ha experimentado con diferentes metodologías que buscan obtener la mayor cantidad de carotenos y antioxidantes mediante la manipulación de las condiciones de cultivo. García et al. (2020) reportaron que el incremento de la salinidad a 35 y 45

UPS condujo a una producción de hasta  $90 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\beta$ - caroteno. Ría, Rahmani, & Suyono (2023) observaron que una irradiancia de  $111.11 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  favoreció la acumulación de carotenoides, alcanzando una concentración de  $13.54 \mu\text{g/ mL}$ .

De la misma manera, Zepeda (2017) evaluó el efecto de distintas intensidades lumínicas entre 100 a  $1600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , determinando que a  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  se alcanza mayor producción de  $\beta$ - carotenos con un rendimiento de  $0.195 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ . Por su parte, Lamers et al. (2010) trabajaron con cultivos por lotes expuestos a una irradiancia de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  logrando una acumulación máxima de pigmentos de  $31 \text{ mg g DW}^{-1}$ . En cuanto a la temperatura, Abu-Rezq et al. (2010) incrementaron esta variable hasta los  $38,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , obteniendo concentraciones de  $\beta$ - caroteno que oscilaron entre  $36,19 - 84,59 \text{ pg c\acute{e}l}^{-1}$ .

A nivel nacional, se han desarrollado pocas investigaciones sobre *Dunaliella*. González (2023) exploró la interacción entre irradiancia y limitación de nutrientes, logrando una producción de  $5.7 \text{ mg/mL}$  del biocompuesto. Por otro lado, Quimi (2023) empleó condiciones de estrés térmico de deficiencia de nitrógeno registrando valores de hasta  $4.78 \text{ mg/l}$  de pigmentos. Aunque dichos resultados son prometedores, se requieren estudios que profundicen en la relación directa entre el estrés combinado por luz y temperatura, y la capacidad antioxidante real de *Dunaliella* sp. bajo tales condiciones.

La capacidad antioxidante de los extractos algales puede medirse mediante pruebas bioquímicas comparativas frente a estándares conocidos. En este sentido, estudios como el de Guevara, Zapata, León, & Acosta (2019) demostraron que un aceite enriquecido con *Dunaliella salina* alcanzó una capacidad antioxidante del 80%, mientras que Rattanaporn et al. (2024) reportaron un valor del IC<sub>50</sub> de 218.00 ± 4.24 en *Scenedesmus falcatus* cultivada bajo alta irradiancia.

Por ello, el presente trabajo presenta como objetivo evaluar la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.*, estresada por alta intensidad lumínica y alta temperatura comparando su rendimiento antioxidante frente a un estándar de referencia, con el fin de comprobar su potencial como fuente natural de protección frente al estrés oxidativo.

### 3. PROBLEMÁTICA

Aunque se han realizado estudios sobre la producción de carotenoides en *Dunaliella sp.* bajo estrés salino, altas intensidades lumínicas, altas y bajas temperaturas; existe un notable desconocimiento acerca de cómo tales condiciones repercuten en la capacidad antioxidante que caracteriza a esta especie. No obstante, las investigaciones que hay sobre esta microalga se ha concentrado mayormente en el estrés salino, provocando un vacío en la comprensión de cómo factores como la alta intensidad lumínica y la temperatura elevada afectan su capacidad antioxidante.

La presencia de especies reactivas de oxígeno, generadas por exposición a la luz, se representa un riesgo significativo debido a la posibilidad de causar daños severos a los componentes fotosintéticos. El estrés oxidativo es equivalente a daño oxidativo, resultando en el deterioro que le provoca de las estructuras celulares, especialmente cuando el daño por oxidación supera la capacidad de reparación de las células.

Son moléculas muy reactivas y pueden interactuar con una amplia variedad de moléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), pigmentos, lípidos, proteínas y otras moléculas celulares. El estrés oxidativo es un fenómeno ampliamente estudiado en organismos fotosintéticos como las microalgas manipulando los rangos normales de intensidad lumínica (60-100  $\mu\text{M}/\text{sm}^2$ ) causando la carotenogénesis.

La alta luminosidad ( $700 \mu\text{M}/\text{sm}^2$ ) estimula la producción de oxígeno singlete por el fotosistema II también conocido como PSII induciendo al estrés foto oxidativo. En el centro de reacción fotosistema II, el oxígeno singlete se genera mediante la interacción del oxígeno molecular con el estado triplete excitado de la clorofila, el fotodaño es inducido por el oxígeno singlete. Las temperaturas altas como  $35^\circ\text{C}$  igualmente inducen la generación de radicales libres de oxígeno en las células y por ello dando comienzo a procesos de estrés oxidativo, lo que produce la carotenogénesis.

La gran parte de los componentes en la naturaleza llegan a sufrir procesos de oxidación, sin embargo, en los organismos eucariotas tienen lugar un proceso inverso a la fotosíntesis, que permite almacenar la energía libre generada durante la oxidación de los carbohidratos y de otros compuestos orgánicos, en forma de ATP. Este proceso origina un radical de oxígeno, que, a pesar de ser fundamentales para los procesos biológicos, su acumulación excesiva puede provocar daños celulares irreversibles. Un aumento de radicales libres puede oxidar macromoléculas y afectar a diversos procesos celulares, lo que está relacionado con el desarrollo de varias enfermedades. Frente a la necesidad de comprender cómo modular esta respuesta en un contexto biotecnológico, surge la siguiente interrogante de investigación: ¿Cuál es el efecto del estrés combinado de alta intensidad lumínica y temperatura sobre la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.*?

## 4. JUSTIFICACIÓN

*Dunaliella sp.*, presenta una característica principal que es su capacidad de perdurar en ambientes con condiciones extremas, así como su adaptabilidad a estos entornos sugiere que bajo estrés lumínico y térmico podría activar mecanismos de defensa que resulten en una mayor producción de antioxidantes. Estos factores juntos pueden hacer que la microalga produzca más ROS (Sies, Jones, & Berndt, 2017). Cuando eso sucede, el organismo tiene que activar mecanismos antioxidantes para defenderse de las especies reactivas de oxígeno, medir cuán buena es esa defensa antioxidante es importante. Nos ayuda a comprender como se adapta *Dunaliella sp.*, y también a ver si puede ser una buena fuente de antioxidantes en condiciones de estrés.

Crear un método para conseguir que *Dunaliella sp.*, produzca más carotenoides es clave. Esto nos ayuda a obtener más antioxidantes. De ese modo, podemos ver que tan buenas son como fuentes de estos compuestos. La aplicación de métodos de estrés, como la alta intensidad lumínica y el incremento de la temperatura, ayudará a verificar la efectividad de estos factores para estimular la producción de carotenoides en *Dunaliella sp.*; este pigmento le sirve a la microalga como un biofiltro protegiendo el aparato fotosintético y limitando el ROS contrarrestando la fotooxidación (Borowitzka, Biology of Microalgae, 2018).

La progresiva demanda de antioxidantes naturales en sectores como la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, debido a sus beneficios para la salud y su capacidad para prevenir el daño celular causado por el estrés oxidativo, es lo que promueve el identificar nuevas fuentes de estos compuestos (Koyande, y otros, 2019). Las microalgas son una opción interesante, y *Dunaliella sp.*, es una de las especies mas prometedoras. Esto se debe a que puede producir muchos antioxidantes, especialmente cuando está bajo estrés.

Si bien *Dunaliella salina* es el referente industrial por su producción masiva de  $\beta$ -caroteno, es esencial evaluar esta cepa particular de *Dunaliella sp.* para determinar si posee un perfil metabólico distintivo o superior. Las cepas no comerciales a menudo reservan una diversidad genética inexplorada que podría traducirse en una respuesta antioxidante más rápida bajo estrés. Por lo tanto, investigar su respuesta específica ante el estrés lumínico y térmico podría revelar un perfil de biosíntesis de antioxidantes único, ofreciendo una alternativa biotecnológica viable y novedosa frente a las opciones ya existentes en el mercado.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1.Objetivo general**

Evaluar la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.*, estresada por alta intensidad lumínica y alta temperatura mediante la comparación con un antioxidante referente para la determinación de su eficacia en la protección celular ante el estrés oxidativo.

### **5.2.Objetivos específicos**

- Evaluar la producción de carotenos en *Dunaliella sp.* sometida a estrés lumínica y aumento de temperatura, mediante análisis espectrofotométricos.
- Determinar la capacidad antioxidante en la microalga estresada por alta iluminación y temperatura.
- Comparar la capacidad antioxidante de la microalga estresada en relación con un antioxidante referente.

## **6. Hipótesis**

Hipótesis Alternativa (H<sub>1</sub>): Las condiciones de alta intensidad lumínica y temperatura provocarán un aumento en la capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.*

## CAPÍTULO II

### 7. MARCO TEÓRICO

#### 7.1. Microalgas como recurso biotecnológico

Las algas son organismos acuáticos que en múltiples ocasiones actúan como bioindicadores de la calidad del agua en los ecosistemas que habitan (Zheng, Zou, Zou, Li, & Lu, 2024). Entre ellas, destacan las microalgas, organismos de menor tamaño que pueden ser unicelulares, y se encuentran tanto en ecosistemas de agua dulce o marina, contribuyendo a la estabilidad del sistema (Shaikh, Rizvi, Pandit, Desai, & Patil, 2022).

Las microalgas son los productores primarios del ecosistema, sirven de alimento para otros organismos de mayor tamaño permitiendo el ingreso de la energía en la cadena trófica (García-Romeral, Pavía-Gómez, Sanz, Chirivella-Martorell, & Serrano-Aroca., 2017). A pesar de su amplia distribución, su presencia se restringe a zonas con condiciones ambientales favorables para su desarrollo, siendo factores como la intensidad lumínica, la disponibilidad de nutrientes y la cantidad de oxígeno determinantes para su adecuado crecimiento (Luna, 2007).

Se encuentran clasificadas en base a la composición bioquímica de su pigmentación. En este sentido, se reconocen 9 clases: las clorofíceas o algas verdes, las crisofíceas o algas pardas doradas, las pirrofíceas o dinoflagelados, las

rodofíceas o algas rojas, las feofíceas o algas pardas y las bacillariofíceas o diatomeas (Hemaiswarya, Raja, Ravikumar, & Carvalho, 2013).

Desde hace décadas, las microalgas son cultivados para suplir diferentes necesidades (Figura 1); especialmente en el campo de la biotecnología, puesto que destacan por su capacidad de producir una amplia variedad de bioproductos, entre los cuales se incluyen biocombustibles como el bioetanol (García-Romeral, Pavía-Gómez, Sanz, Chirivella-Martorell, & Serrano-Aroca., 2017).

**Figura 1.**

*Uso biotecnológico de las microalgas.*



*Nota:* Tomado de (García-Romeral, Pavía-Gómez, Sanz, Chirivella-Martorell, & Serrano-Aroca., 2017)

El objetivo principal de estas investigaciones ha sido la producción de suplementos alimenticios, aunque en la práctica se ha concentrado principalmente en géneros como *Spirulina*, *Dunaliella*, y *Chlorella* (Bertoldi, Sant'Anna, & Olivier, 2008). Se ha buscado maximizar la producción de estos organismos, desarrollando estrategias que incluyen el uso de lagos naturales donde se producen proliferaciones masivas de determinadas especies, las cuales son explotadas mediante cultivos *in situ*.

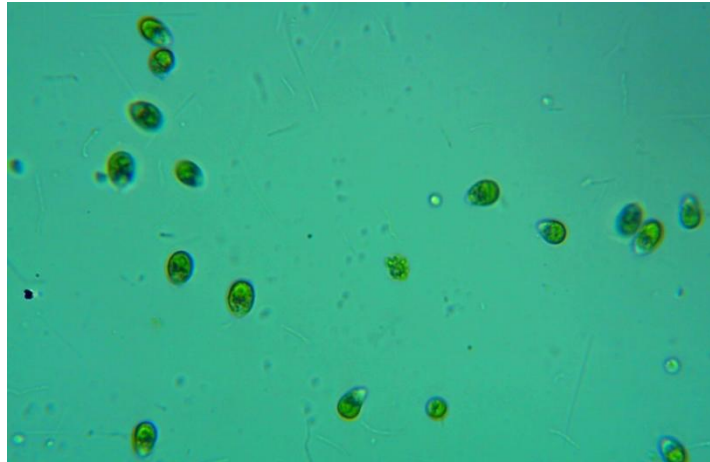
Se ha reconocido el potencial de ciertas microalgas como fuente sostenible de compuestos de alto valor añadido para numerosas industrias. Un ejemplo es *Dunaliella salina*, empleada por su elevada capacidad de producir pigmentos como el  $\beta$ - caroteno, así como *Haematococcus pluvialis* que destaca por la síntesis de astaxantina (Hemaiswarya, Raja, Ravikumar, & Carvalho, 2013).

## **7.2. Características generales del género *Dunaliella*.**

Las células pertenecientes al género *Dunaliella* presentan una morfología variable que puede ser esférica, ovoide o elipsoide, posee dos flagelos situados en la parte posterior de la célula (Figura 2). Su tamaño depende tanto de la especie como de las condiciones ambientales, con longitudes que oscilan entre 2 a 28  $\mu\text{m}$  y un ancho que varía de 3 a 13  $\mu\text{m}$  (Oren, 2010).

## Figura 2.

*Morfología celular de Dunaliella sp. bajo microscopía óptica.*



**Nota:** Observación realizada en un aumento de 40x

En el interior de las células se encuentra un único cloroplasto de gran tamaño ocupando gran parte del volumen celular, además contiene un pirenoide central, presentan tilacoides agrupado de manera anómala y que suelen entrar al pirenoide; en los espacios intertilacoides se almacenan gotas oleosas de carotenoides y a medida que este contenido de carotenoide crece se va extendiendo por todo el cloroplasto provocando que el color de la célula cambie a un naranja o rojo (Borowitzka & Siva, 2007).

Bajo condiciones desfavorables, como el estrés osmótico adoptan una forma esférica, asimismo, en cultivos antiguos y a bajas temperaturas, pueden adquirir una forma ameboide debido al rompimiento de los microtúbulos presentes en el citoesqueleto (Borowitzka & Siva, 2007);

La reproducción del género *Dunaliella* puede ser tanto asexual como sexual. La reproducción sexual ocurre por isogamia, un proceso en la que dos células se junta para formar un cigoto. Sin embargo, si las condiciones del medio no son favorables surge la división asexual mediante la formación de células aplanosporas y palmeloides con división longitudinal de la célula (Barbosa, Inácio, Afonso, & Maranhão, 2023).

### 7.3. Clasificación taxonómica de *Dunaliella*

La clasificación taxonómica del género de algas verdes *Dunaliella* suele resultar confusa y controversial por la variabilidad morfológica y fisiológica que presentan. Sin embargo, la propuesta más aceptada corresponde a la siguiente:

#### **Clasificación taxonómica de *Dunaliella***

**Dominio:** Eucaryota

**Reino:** Plantae

**Filo:** Chlorophyta

**Clase:** Chlorophyceae

**Orden:** Volvovales

**Familia:** Dunaliellaceae

**Género:** *Dunaliella* (Guiry, 2024)

#### 7.4. Distribución y hábitats

Los organismos que pertenecen al género *Dunaliella* pueden encontrarse en una variedad de hábitats desde aguas dulces hasta aguas eurihalinas. Existen registros de su presencia en lagos con pH muy bajo o ambientes hipersalinos como los lagos de sal de la Antártida, donde constituyen los principales organismos fotosintéticos. Un ejemplo notable es el Great Salt Lake, en el que la coloración rosada de algunas zonas refleja las floraciones masivas de distintas especies de *Dunaliella* (Figura 3) (Oren, 2010).

#### Figura 3.

*Great Salt Lake con variaciones de coloración asociados a floraciones de Dunaliella.*



**Nota:** La tonalidad rosada o rojiza en el agua se debe a altas concentraciones de carotenoides producidos por microalgas del género *Dunaliella* en condiciones de salinidad extrema. Tomado de Oren, 2010.

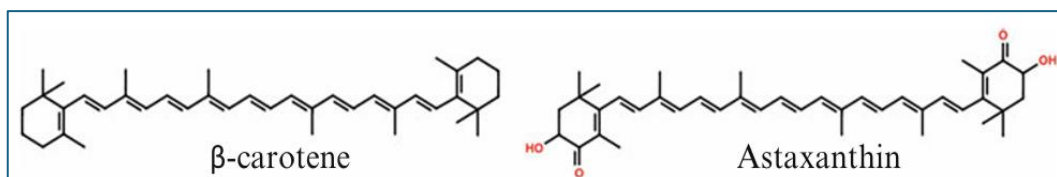
## 7.5. Carotenoides en microalgas

Los carotenoides son pigmentos lipofílicos con una abundante dispersión natural, sus rangos de colores van desde el naranja hasta el amarillo dependiendo de su estructura química. Existen dos grupos principales de carotenoides: los carotenos que son el grupo conformado por hidrocarburos y las xantofilas, que contienen moléculas de oxígeno en su estructura molecular (Lafarga, Clemente, & Garcia-Vaquero, 2020).

De acuerdo con su función biológica, los carotenoides se dividen en dos clases: los carotenoides primarios que actúan como componentes funcionales del aparato fotosintético de las células contribuyendo a la supervivencia del organismo y los otros carotenoides son los secundarios que solo aparecen mediante la carotenogénesis que ocurre cuando el organismo se ve expuesto a un ambiente desfavorable (Henríquez, Escobar, Galarza, & Gimpel, 2016). En los carotenos se encuentran moléculas como  $\beta$ -caroteno o licopeno; y los carotenoides xantofilas se hallan a luteína y la astaxantina.

### Figura 4.

*Estructuras químicas de los carotenoides  $\beta$ - caroteno y astaxantina.*



*Nota:* Henríquez, Escobar, Galarza, & Gimpel, 2016

Los carotenoides cumplen funciones fotoprotectoras y antioxidantes, actúan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis, absorbiendo luz especialmente azul y transfiriendo esa energía a la clorofila (Aditi, Bhardwaj, Yadav, Swapnil, & Meena, 2025). Entre ellos, la luteína y la fucoxantina son carotenoides de captación primaria de luz, siendo esta última particularmente eficiente con una transferencia energética cercana al 80% hacia complejos clorofílicos.

Además, los carotenoides ayudan a disipar el exceso lumínico mediante el ciclo xantófilo, el cuál redirige la energía sobrante hacia mecanismos de disipación térmica. Por otro lado, la luteína es el carotenoide predominante en géneros como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Muriellopsis*, llegando a alcanzar varios mg/L de cultivo, por ejemplo, *Chlorella sorokiniana* puede alcanzar cantidades de hasta 24 mg/L bajo condiciones optimizadas (Sathasivam & Ki, 2018).

## **7.6. Métodos de extracción y cuantificación**

Para aislar carotenoides de microalgas se utilizan principalmente extracciones con solventes orgánicos tradicionales, tales como: hexano, acetona, THF, acetato de etilo, entre otros (Morón-Ortiz, Mapelli-Brahm, & Meléndez-Martínez, 2024).

La biomasa algal suele ser sometida a procesos de liofilización o desintegración celular, tras lo cual se realiza la extracción de compuestos en mezclas de disolventes polares y apolares. Estos métodos buscan optimizar el rendimiento y la selectividad de la extracción sin comprometer la estabilidad de los pigmentos, evitando etapas agresivas como la saponificación, que puede ocasionar la degradación de carotenoides (Fernández, Flórez, Buitrago, & Baquero, 2017).

Para cuantificar los carotenoides extraídos se emplea sobre todo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detectores de arreglo de diodos (DAD) o acoplados a espectrometría de masas, lo que permite separar e identificar individualmente cada carotenoide isómero (Jin et al., 2019).

La espectrofotometría UV/Vis es otra técnica complementaria, midiendo absorbancia de extractos: se utilizan longitudes de onda características y coeficientes de extinción conocidos. No obstante, ésta puede resultar menos precisa debido al solapamiento de espectros, por lo que suele usarse para estimados rápidos y se considera la cromatografía como referencia más confiable (Casella et al., 2020).

## **7.7. Estrés abiótico en microalgas**

El estrés abiótico se define como el estado en el cual factores ambientales adversos impiden el funcionamiento normal de las células y reducen su crecimiento. Estos factores incluyen cambios extremos de luz, temperatura, salinidad, pH, sequía, presencia de metales tóxicos, contaminantes, etc. Cuando más de uno de estos parámetros se sale de los rangos óptimos, las microalgas experimentan estrés abiótico severo, típico de ambientes extremófilos (Cruz, 2017).

### **7.7.1. Efecto de la alta intensidad lumínica.**

Al incrementarse la intensidad lumínica, la tasa fotosintética sube hasta un límite; más allá de él, la célula entra en fotoinhibición, perdiendo eficiencia fotosintética e incluso muriendo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Manipular la duración del fotoperíodo y el uso de luz pulsada pueden evitar el fotodaño de las células de microalgas y crear las condiciones idóneas para la absorción eficiente de los fotones de luz (Maltsev, Maltseva, Kulikovskiy, & Maltseva, 2021).

Bajo condiciones de irradiancia extrema, las microalgas generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en su aparato fotosintético, lo que ocasiona daño en proteínas y membranas celulares. Pero, como mecanismo de defensa, muchas especies, entre ellas *Dunaliella salina*, incrementan la acumulación de pigmentos con función antioxidante. En este contexto, *D. salina* es reconocida por su

capacidad de sintetizar carotenoides, particularmente  $\beta$ -caroteno (Wu, Duangmanee, Zhao, Juntawong, & Ma).

### **7.7.2. Efecto de la temperatura.**

La temperatura regula la rapidez de las reacciones metabólicas, de modo que la generación de biomasa microalgal se incrementa a medida que esta aumenta, hasta alcanzar un valor óptimo característico de cada especie, usualmente en el rango de 28–35 °C (Hernández-Pérez & Labbé, 2017).

En *Dunaliella viridis*, Arena et al. (2021) observaron un incremento en la producción de lípidos ( $20,41 \pm 2,63$  %) cuando los cultivos fueron expuestos a temperaturas elevadas de hasta 34 °C. En contraste, Elisabeth et al. (2021), recopilando diferentes estudios, señala que, al reducir la temperatura por debajo de 25 °C, las especies de *Dunaliella* tienden a aumentar la síntesis de  $\beta$ -caroteno mientras disminuye el contenido de clorofila.

### **7.8. Antecedentes y estudios previos**

Varios estudios demostraron que *Dunaliella spp.* responde fuertemente al estrés lumínico y térmico mediante la producción de mecanismos antioxidantes.

Por ejemplo, Xi et al. (2021) evaluaron el efecto que tendría la alta intensidad lumínica en *Dunaliella salina* y observaron que el aumento de la radiación lleva a un incremento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que se llega a relacionar positivamente con la acumulación de  $\beta$ -caroteno. Asimismo, el estudio de la transcriptómica exhibió la incitación de genes relacionados con la biosíntesis de carotenoides y la detención de genes relacionados con la fotosíntesis, corroborando el rol protector de estos pigmentos frente al exceso de energía lumínica.

Del mismo modo, Seepratoomrosh et al. (2016) estudiaron a *Dunaliella tertiolecta* bajo condiciones de alta irradiancia ( $1,000\text{--}2,000 \mu\text{mol fotones}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y varios parámetros fisicoquímicos, consiguiendo descubrir que la combinación de alta luz y elevada temperatura provoca fotoinhibición severa y disminución del crecimiento celular, siendo sugerente a un efecto sinérgico entre ambos estresores sobre el aparato fotosintético.

Por su parte, Roy et al. (2021) compilaron evidencia de cómo *Dunaliella salina* desarrolla significativamente la actividad de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) y deshidroascorbato reductasa (DHAR) cuando se encuentra expuesta a luz intensa en mezcla con temperaturas moderadas-altas ( $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Estos autores marcan que, aunque la catalasa (CAT) no presenta una inducción proporcional, la acumulación de  $\beta$ -caroteno y la activación de peroxidasas permiten a la célula atenuar la abundancia de ROS formado por la sobreexcitación fotosintética.

En microalgas distintas a *Dunaliella*, se han detallado respuestas similares; He et al. (2018) reportaron que *Monoraphidium dybowskii* sometida a altas temperaturas (35 °C) bajo luz intensa exhibió una disminución en la eficiencia fotosintética (Fv/Fm) además de un aumento en el almacenamiento de lípidos neutros, lo que evidencia una desviación metabólica hacia la producción de compuestos de reserva frente a condiciones de estrés combinado.

Además, Shi et al. (2020) mencionan que cuando la temperatura aumenta las microalgas también aumentan su estrés oxidativo, lo que beneficia debí a que conlleva a la acumulación de carotenoides, lo que ayuda a protegerlas provocados por los compuestos generados por el estrés.

También, estos estudios muestran que la combinación de alta intensidad lumínica y temperatura no solo genera un incremento de ROS y daño oxidativo en microalgas, sino que también provoca respuestas adaptativas, principalmente en *Dunaliella spp.*, donde la acumulación de  $\beta$ -caroteno y la activación de sistemas

antioxidantes enzimáticos representan estrategias clave de fotoprotección y soportar el estrés.

## **CAPÍTULO III:**

### **8. MARCO METODOLÓGICO**

#### **8.1. Tipo de investigación**

El presente trabajo fue de tipo experimental puesto que manipula variables de temperatura y luminosidad en cultivos de *Dunaliella sp.* De manera complementaria, siguió una metodología cuantitativa que permitió medir la producción de carotenoides y la capacidad antioxidante a través de métodos analíticos como la espectrofotometría y la comparación de resultados con un antioxidante estándar.

#### **8.2. Origen de la cepa de *Dunaliella sp.***

Cabe mencionar que el trabajo se llevó a cabo bajo el marco del proyecto I+D+I-XVII-2023-4- Carotenoides en microalgas financiado por CEDIA, mismo que cuenta con el respectivo permiso del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAATE) bajo el código MAATE-DBI- CM2022-0264. La cepa de *Dunaliella spp.* con la que se trabajó se encuentra registrada con el código PM018 de la colección de microalgas del Centro de Investigaciones Biológicas y Prácticas Académicas-CIBPA.

El componente experimental se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias del Mar y los análisis bioquímicos en los laboratorios de investigación de la Universidad Estatal de Bolívar.

### 8.3. Medios de cultivo y pruebas de crecimiento vegetativo

#### 8.3.1. Preparación del medio Guillard F/2:

Para preparar las diferentes soluciones del medio Guillard F/2 se colocó un volumen determinado de agua destilada en cada uno de los envases con la finalidad de asegurar la inocuidad y evitar la contaminación del medio. Después, se le adicionó los macronutrientes, micronutrientes y vitaminas correspondientes a cada solución según lo sugerido en la tabla 1. Luego de disolver el contenido se esterilizó en autoclave, para dejarlo en reposo y finalmente colocarlo en refrigeración a 3°C.

**Tabla 1.**

*Soluciones químicas del Medio de cultivo Guillard F/2*

<b>Solución 1:</b>	<b>g/100 mL</b>
Nitrato de Sodio (NaNO <sub>3</sub> )	7.5
Fosfato monobásico de sodio monohidratado (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0.5
<b>Solución 3:</b>	<b>g/100 mL</b>
Cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0.32
EDTA disódico (Na <sub>2</sub> ·EDTA)	0.44
<b>Solución traza</b>	<b>0.10 mL</b>
Sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	0.49

Sulfato de zinc heptahidratado ( $ZnCl_2 \cdot 7H_2O$ )	1.1
Cloruro de zinc ( $ZnCl$ )	0.53
Cloruro de cobalto (III) hexahidratado ( $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ )	0.5
Cloruro de manganeso (III) tetrahidratado ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ )	9.0
Molibdato de sodio dihidratado ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.32
<b>Solución 4</b>	<b>mg</b>
Tiamina B1	0.1
Cianocobalamina B12	0.5

*Nota:* Tabla obtenida de Guillard (1975).

### 8.3.2. Mantenimiento de cepas

Se preparó 100 mL de agua de mar filtrada y esterilizada, a la cual se le adicionaron las soluciones del medio Guillard F/2 y 1.5 g de Bacto agar. La mezcla se llevó a ebullición y posteriormente se esterilizó en la autoclave a 121°C. El medio se distribuyó en 5 placas Petri y se dejó solidificar en un ambiente estéril, para luego sembrar 50  $\mu$ L de un cultivo concentrado (Julissa, 2023).

Las placas recién sembradas se colocaron a una intensidad lumínica de 50  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> y una temperatura de 22 ± 1°C. Tras dos semanas, se corroboró el

crecimiento de las colonias y la ausencia de contaminación. De cada placa se seleccionaron las colonias con mejor desarrollo y se transfirieron a 15 tubos de ensayos, cada uno con un volumen de 15 mL de agua de mar filtrada, esterilizada y fertilizada con el medio de cultivo. Los tubos se mantuvieron a la misma iluminación y temperatura que las placas y se les proporcionó aeración manual 4 veces por día para mantener el oxígeno disuelto a 8 mg/L y el pH en rangos de 7.5 a 8.5.

### **8.3.3. Cultivos vegetativos**

Transcurrida dos semanas, los cultivos de 15 mL fueron trasferidos a un volumen de 150mL en envases de 300mL de capacidad con la finalidad de aumentar la concentración celular (Serpa & Abelardo Calderón Rodríguez, 2016). Conjuntamente, se elaboró la curva de crecimiento para conocer la cinética de crecimiento celular y establecer el momento adecuado para realizar las transferencias a un volumen mayor. Es así como, se efectuaron conteos celulares en una cámara de Neubauer cada 24 horas (Torrentera Blanco & Tacon, 1989), usando un microscopio OMAX.

Para determinar la densidad celular se utilizó la formula establecida por Vega, B. O., D., T., & M., (2017):

$$DC = N \cdot 10^4 \cdot dil$$

Donde:

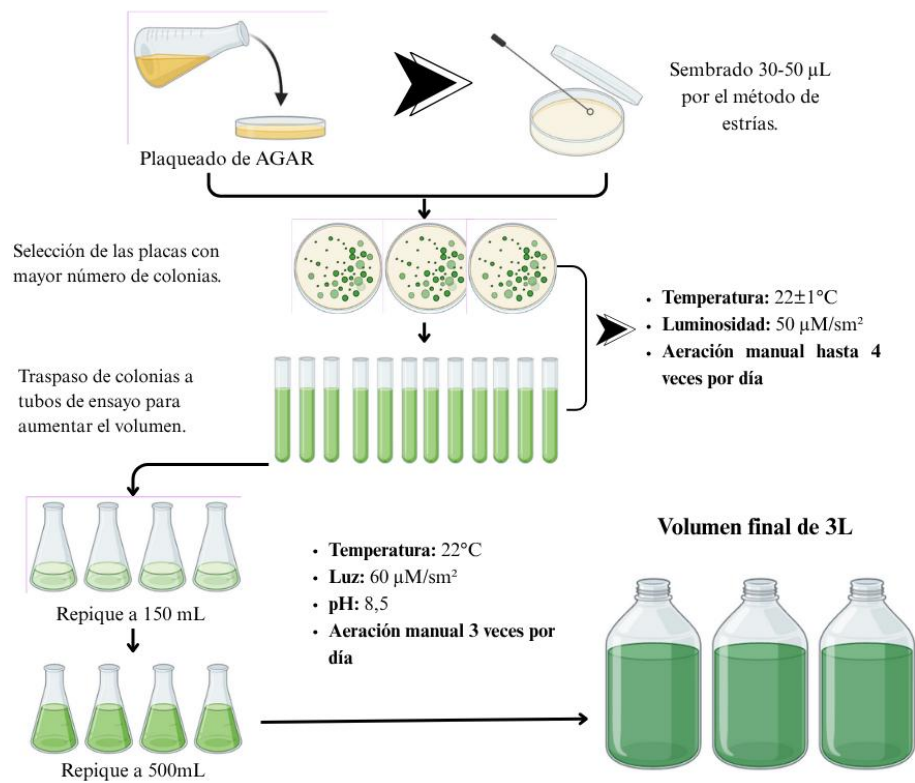
- $DC = \text{cel/mL}$
- $N = \text{promedio de células presentes en } 1 \text{ mm}^2(0.1 \mu\text{L})$
- $\text{dil} = \text{factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra)}$

Después de 16 días, se realizó repique a 500 mL. Los cultivos se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura constante ( $22^\circ\text{C}$ ), iluminación de  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  y aireación manual tres veces al día.

Los repiques se efectuaron de acuerdo con lo establecido por la curva de crecimiento hasta alcanzar un volumen total de 3 L, el cual fue transferido a envases de 4 L de capacidad, dejando un espacio libre para asegurar un adecuado intercambio gaseoso y prevenir deficiencias de oxígeno en el cultivo (Figura 5).

**Figura 5.**

*Esquema del proceso de cultivo de Dunaliella sp.*



**Nota:** Una vez obtenido el volumen final, las muestras se distribuyeron en los diferentes grupos iniciando la fase experimental de inducción a estrés.

#### 8.4. Inducción a estrés

La fase de estrés se realizó en un espacio controlado con dimensiones de 1.35m de altura, 3m de ancho y 1m de profundidad, cuya parte frontal fue cubierta con el fin de concentrar la temperatura y focalizar la luz en los diferentes grupos experimentales.

En el grupo 1 (G1) las lámparas se colocaron en proximidad a los cultivos, alcanzando una intensidad lumínica de  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , medida con un luxómetro de amplio espectro. La exposición a la luz fue continua las 24 horas del día durante toda la fase de estrés, mientras que la temperatura se mantuvo en un rango normal de  $23^{\circ}\text{C}$  (Zepeda, E. G. 2017).

En el grupo 2 (G2), el espacio se cerró completamente, lo que permitió incrementar la temperatura manteniéndola en  $28^{\circ}\text{C}$ , pero a diferencia de G1, la luminosidad permaneció en  $60\text{-}100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  similar a la fase vegetativa (Jitpisut Seepratoomrosh et al., 2015).

El grupo 3 (G3) fue sometido a la combinación de factores de estrés, es decir, a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  y a una luminosidad de  $700 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Abu-Rezq, y otros, 2010).

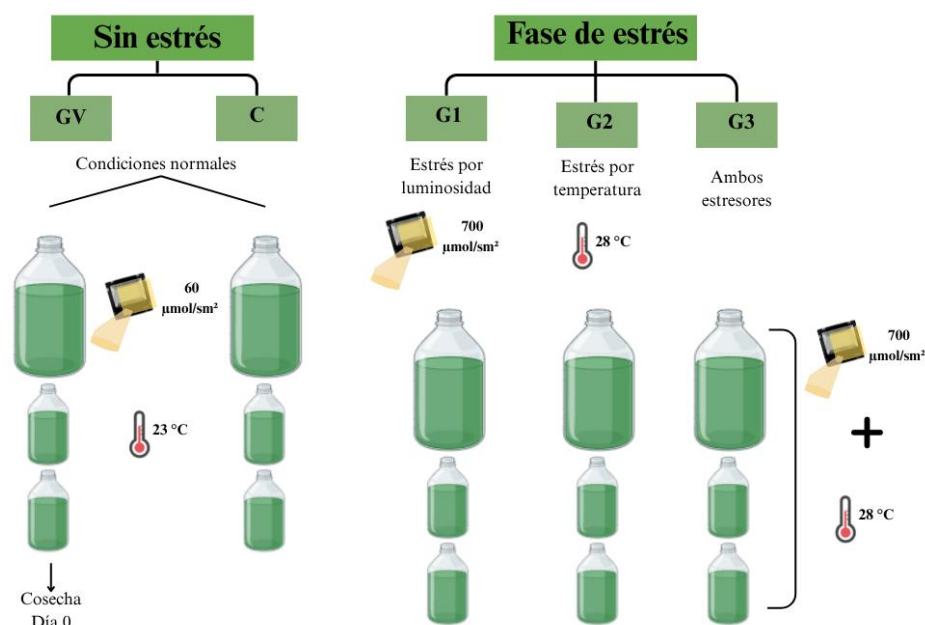
Además de los tres grupos sometidos a estrés, se incluyeron dos grupos de referencia:

El primero correspondió al grupo vegetativo (GV) se cosechó justo antes de iniciar la fase de estrés y se utilizó como punto de referencia basal para conocer los niveles iniciales de carotenoides y capacidad antioxidante bajo condiciones

normales y el segundo correspondió al grupo control (C), el cual se mantuvo durante todo el experimento en las mismas condiciones de la fase vegetativa: 23 °C de temperatura e iluminación de  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , garantizando así una comparación adecuada con los grupos estresados (Figura 6).

**Figura 6.**

*Diseño experimental de la fase de estrés.*



**Nota:** Representación de los grupos control y los tratamientos sometidos a estrés lumínico, térmico y combinado.

Cabe recalcar que, los parámetros fisicoquímicos se analizaron cada dos días para evitar variaciones que pudieran afectar los resultados del experimento. Asimismo, se realizó una fertilización cada 5 días evitando que las microalgas se vieran sometidas a un estrés adicional por deficiencia de nutrientes.

## 8.5 Cinética de crecimiento microalgal en *Dunaliella sp.*

### 8.5.1. Tasa de crecimiento específica

La tasa de crecimiento específica se determinó siguiendo el modelo descrito por Astocondor et al. (2017), mediante la ecuación:

$$\text{Tasa de crecimiento de la población } (\mu_e) = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_o}\right)}{\Delta t}$$

Donde:

- $N_o$  = tamaño de la población al inicio de un intervalo de tiempo
- $N_t$  = tamaño de la población al final de un intervalo de tiempo
- $\Delta t$  = intervalo de tiempo ( $t_f - t_0$ ) en días.

### 8.5.2 Tasa de duplicación

La tasa de duplicación ( $tg$ ) se calculó a partir de la siguiente expresión, descrita por Vega, B. O., D., T., & M., (2017)

$$tg = \frac{\ln 2}{\mu_e}$$

- $\ln 2 = \text{constante } 0.693$
- $\mu_e = \text{Tasa de crecimiento de la población.}$

### 8.5.3. Productividad celular

También, se calculó la productividad celular de cada cultivo en estrés la cual está dada por la siguiente formula:

$$\text{Biomass productivity } (g * L^{-1} * d^{-1}) = \Delta_x / \Delta_t = (X_t - X_0) / (t - t_0)$$

Donde:

- $X_0$  = peso seco al inicio de un intervalo de tiempo
- $X_t$  = peso seco al final de un intervalo de tiempo
- $\Delta t$  = intervalo de tiempo ( $t_f - t_0$ ) en días (Badar, Yaakob, & Timmiati, 2016).

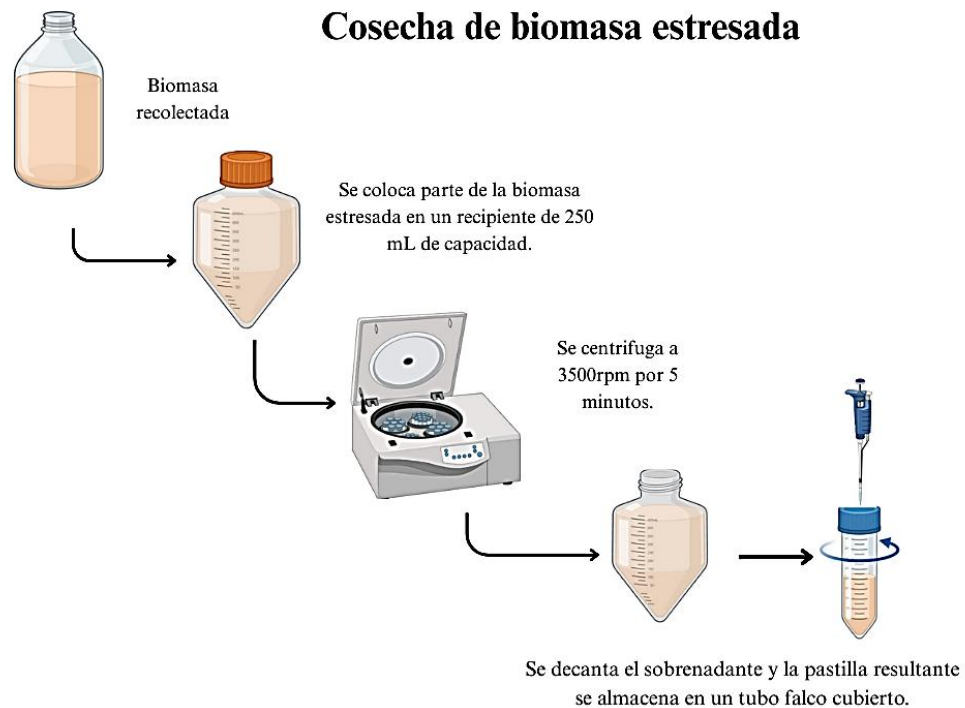
## 8.6. Obtención de biomasa para análisis bioquímicos.

### 8.6.1. Cosecha de biomasa.

Una vez finalizada la fase de estrés, cada grupo fue cosechado mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se adicionó NaCl al 1%, repitiéndose la centrifugación bajo las mismas condiciones (Grima et al., 2002). Este procedimiento permitió obtener un pellet libre de impurezas que pudieran interferir en los análisis posteriores. Las muestras se almacenaron en cajas Petri o tubos de ensayo, debidamente rotulados con el grupo correspondiente, la fecha de cosecha y la corrida experimental, para luego ser conservadas en refrigeración (Figura 7).

**Figura 7.**

*Cosecha de biomasa estresada obtenida de cada grupo inducido a estrés.*



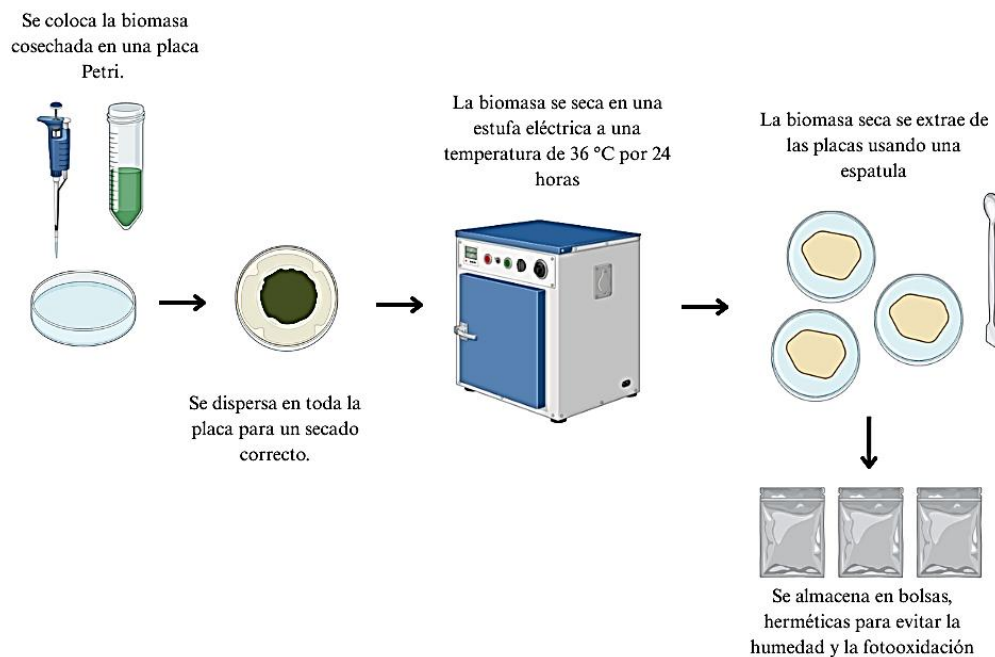
**Nota:** Protocolo de separación de biomasa mediante centrifugación y recuperación del pellet celular en tubo Falcon.

### 8.6.2. Secado de biomasa

Cuando se obtuvo la cantidad suficiente de biomasa, se la sometió a un proceso de secado en una estufa eléctrica a 36 °C durante 24 horas, o hasta asegurar la completa eliminación de la humedad residual. La biomasa seca se almacenó en sobres de papel, los cuales fueron conservados en un lugar seco, verificando periódicamente que no presentaran reabsorción de humedad ambiental (Figura 8).

## Figura 8.

### *Proceso de secado de la biomasa de Dunaliella sp.*



**Nota:** La biomasa se almacena en un lugar seco ya que la biomasa es higroscópica (absorbe humedad del ambiente rápidamente).

## 8.7. Análisis bioquímicos: carotenos totales y antioxidantes

### 8.7.1. Carotenoides totales

Como primer paso se pesó 105 mg de biomasa seca en tubos Falcon de 15 mL de capacidad, los cuales se cubrieron con papel aluminio para evitar la fotooxidación de los pigmentos. A cada tubo se añadió entre 8 a 10 perlas de acero para favorecer la disrupción celular y mejorar la extracción, además, se le adicionó 5 mL de Metanol al 90 % para después ser llevado a vórtex donde se agitó por 3 minutos a 3000RPM. Posteriormente, las muestras se mantuvieron en reposo a -4°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de espera se volvió a agitar en vórtex por

3 minutos; después, se centrifugaron a 3500 RPM por 5 minutos, el sobrenadante se separó en un matraz forrado con papel aluminio para evitar la degradación de los pigmentos. Este proceso se repitió 5 ciclos o hasta que el sobrenadante se mostrara totalmente transparente (Macías-Sánchez, C. Mantell, Ossa, Lubian, & Montero, 2009).

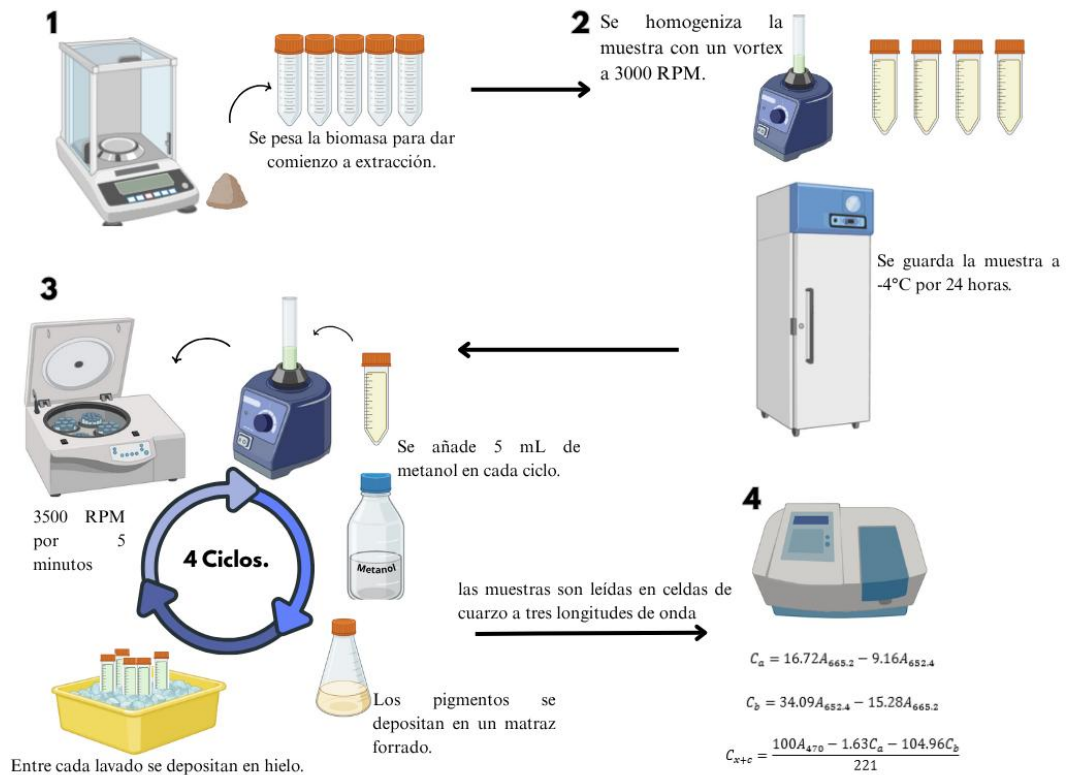
El extracto resultante se leyó en un espectrofotómetro con ayuda de una celda de cuarzo y se calibró usando Metanol al 90% como blanco. Finalmente, se leyeron a tres longitudes de onda 665.2, 652.4 y 470 nm (Figura 9).

Para la cuantificación de carotenoides totales se utilizó la formula descrita por Lichtenthaler & Buschman (2001).

$$C_a = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$$
$$C_b = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$$
$$C_{x+c} = \frac{100A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b}{221}$$

**Figura 9.**

*Cuantificación de carotenoides totales por espectrofotómetro.*



**Nota:** Pasos para la extracción con solvente orgánico y determinación de carotenoides totales.

### 8.7.2. Análisis de capacidad antioxidante

Para determinar la capacidad antioxidante se usó la técnica desarrollada por Brand-Williams et al., (1995) que consiste en la neutralización del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo por parte de los compuestos antioxidantes que presente la muestra, haciéndose visible por el cambio de color pasando de un morado oscuro a amarillo.

### 8.7.2.1. Extracción de antioxidantes

Para asegurar la recuperación integral de la fracción antioxidante, se utilizó un protocolo de extracción secuencial bipolo que permite aislar tanto compuestos polares como apolares. La extracción de antioxidantes comenzó pesando 100 mg de biomasa seca de cada muestra en la balanza analítica, seguidamente se colocaron en un tubo con 10 perlas de acero y se llevó al vortex por un minuto a 2800 RPM. De la muestra homogenizada se pesó 15 mg que se colocaron en microtubos Eppendorf ámbar, con 100  $\mu$ L de agua destilada para homogenizarlo en el vórtex durante 15 segundos. Pasado este tiempo se refrigeró la muestra a 10°C por 30 minutos para inhibir la actividad biológica durante la rehidratación.

Seguidamente, se adicionó 500  $\mu$ L de metanol grado HPLC o analítico y se agitó por 15 segundos utilizando el vortex a 2800 RPM. Después, se añadió 500  $\mu$ L de Cloroformo grado analítico y se agitó en vortex por 15 segundos más, las muestras se llevaron a centrifugar a 5000 RFC por 5 minutos; el sobrenadante se depositó en un balón de aforo ámbar de 5 mL.

El proceso se repitió desde la adición de metanol hasta obtener un sobrenadante completamente transparente para luego aforar los balones a 5 mL usando Metanol, y guardar los extractos a -20°C de temperatura hasta su análisis al día siguiente (Rowland, Stefanie, & Laurens, 2022).

### 8.7.2.2. Preparación del reactivo 1,1-difenil-2-picrilidracilo (DPPH)

Se preparó 100 mL de DPPH a una concentración de 0.06 mM, para ello se pesó en la balanza analítica 2.4 mg del reactivo y se trasladó a un balón donde se aforó usando Metanol Grado HPLC hasta llegar al volumen de 100 mL. Se cubrió el balón de aforo con papel aluminio y se guardó en un lugar oscuro.

### 8.7.2.3. Preparación de la Curva Estándar

Para realizar la curva de calibración también conocida como curva estándar se usó Trolox. Primero se realizó una solución madre a una concentración de 1000  $\mu\text{M/L}$  pesando 2.5 mg del reactivo Trolox Marca Sigma Aldrich que después se aforó con Metanol en un balón de 10 mL; de la solución madre se sacaron alícuotas a diferentes concentraciones que iban desde 200  $\mu\text{M/L}$  hasta 800  $\mu\text{M/L}$  utilizando la fórmula:

$$C_f = \frac{C_i * V_i}{V_f}$$

Donde:

$C_f$  = Concentración requerida

$C_i$  = Concentración inicial

$V_i$  = Volumen inicial

$V_f$  = Volumen final

#### 8.7.2.4 Lectura de la curva estándar

Para comenzar con la lectura, primero se añadió 975  $\mu\text{L}$  del DPPH al 0.06 mM en varios microtubos de 1.5 mL, a los cuales se les añadió 25  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones del Trolox y se dejó reposar en completa oscuridad por 35 minutos y a una temperatura ambiente. Por último, se realizó la lectura en NanoDrop a una longitud de onda de 515 nm por triplicado para la veracidad de cada punto de la curva Estándar.

Los resultados fueron tabulados en Excel para analizar todos los puntos en el programa y obtener la recta, para después utilizar la siguiente ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde:

- $x$  =capacidad antioxidante del compuesto.
- $y$  =absorbancia obtenida.
- $b$  =intercepto.
- $m$  =pendiente de la recta. (Vega, B. O., D., T., & M., 2017)

Para obtener la capacidad antioxidante se despejó la incógnita  $x$  de la fórmula obteniendo un resultado cuya unidad fue el  $\mu\text{mol}$  equivalente Trolox.

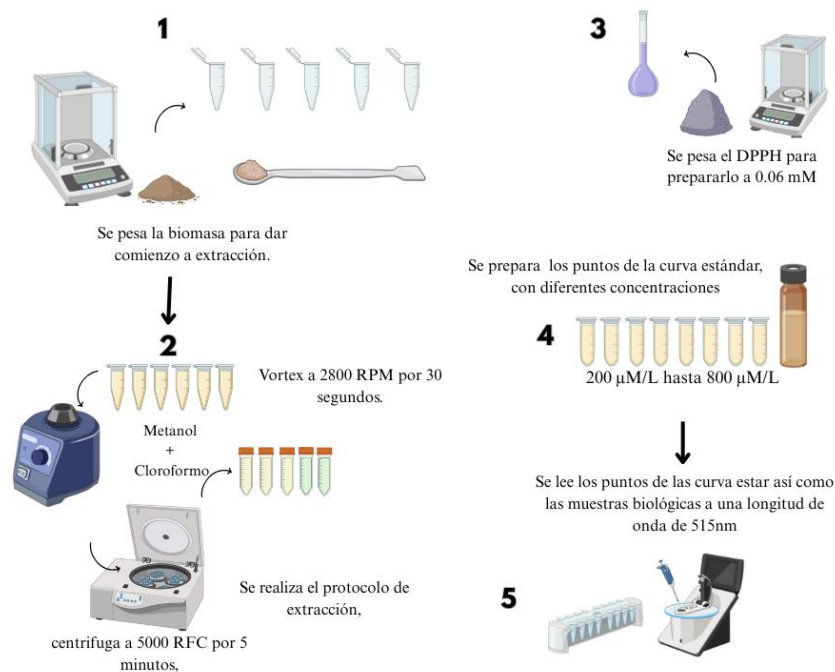
### 8.7.2.5 Lectura de los extractos de cada muestra

Para la lectura de cada extracto, primero se añadió 975 µL del DPPH y se usó 25 µL de cada extracto, esto se realizó por triplicado y se leyeron a una longitud de onda de 515 nm. Utilizando la fórmula de la recta que se consiguió a partir de la curva estándar se reemplazó los valores obtenidos de la misma, así como las absorbancias que se obtuvieron de cada muestra; adicionalmente se calculó el % de inhibición dado por la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición del DPPH} = \frac{\text{Abs blanco} - \text{Abs corregida de la muestra}}{\text{Abs blanco}} \times 100$$

**Figura 10.**

*Metodología para extracción y cuantificación de capacidad antioxidante.*



**Nota:** Pasos para la extracción con solventes orgánicos y determinación de capacidad antioxidante con DPPH.

## **8.8. Análisis estadísticos**

Para el análisis estadístico se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y homogeneidad de Levene's con el objetivo de evaluar la distribución de las variables. En el primer objetivo donde no se cumplieron los supuestos estadísticos se realizaron pruebas no paramétricas. En el segundo objetivo al cumplirse los supuestos se realizó una prueba ANOVA de una vía para confirmar las diferencias significativas entre los grupos, posteriormente se realizó una prueba Tukey's HSD Test, para observar que grupos presentaban las diferencias. Se realizó una correlación de Pearson con la finalidad de observar si existe una relación entre la cantidad de carotenoides y la actividad antioxidante.

## CAPÍTULO IV:

### 9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 9.1 Crecimiento celular y producción de carotenoides totales en *Dunaliella sp.*

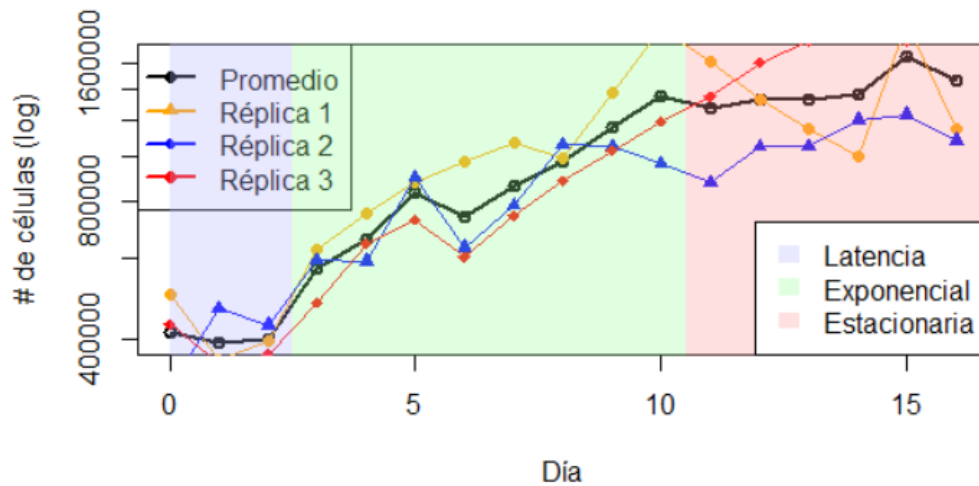
Aunque los resultados de cinética de crecimiento no son directamente parte de los objetivos principales; se exhiben con la finalidad de tener conocimiento del comportamiento que presenta el organismo bajo las condiciones experimentales, la curva de crecimiento, la tasa de crecimiento, tasa de duplicación y productividad nos permitieron analizar el comportamiento fisiológico de manera previa a los análisis principales.

##### 9.1.1. Determinación de la curva de crecimiento.

El conteo en cultivos con un volumen de 120 mL evidenció que la fase inicial de crecimiento se prolongó hasta el tercer día, seguido de un aumento exponencial entre el quinto y décimo día, pasando de  $6,91 \times 10^5$  a  $1,19 \times 10^6$  cel/mL (Figura 11). De esta manera se estableció el sexto día como el ideal para realizar las transferencias puesto que, en esta etapa las células continuaban dividiéndose activamente y aún no alcanzaban limitaciones nutricionales o acumulación de metabolitos.

**Figura 11.**

*Cinética de crecimiento de Dunaliella sp.*



**Nota:** El promedio (línea negra) representa la tendencia general del crecimiento celular entre réplicas, evidenciando ligeras variaciones individuales en la fase exponencial.

### 9.1.2. Crecimiento celular durante la fase experimental

Durante la fase experimental, el grupo dos (G2) presentó la mayor tasa de crecimiento específica ( $\mu=0,1095 \text{ día}^{-1}$ ) con un tiempo de duplicación de 6,33 cel/día y una productividad de  $0,043 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{día}^{-1}$ . No obstante, el grupo control (C) mostró una tasa de crecimiento de  $0,0438 \text{ día}^{-1}$ , con una productividad celular intermedia de  $0,027 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{día}^{-1}$  y un tiempo de duplicación de 15,38 cel/día indicando que, aunque el crecimiento fue menor que en G2, la ausencia de estrés adicional permitió un desarrollo constante.

Por otro lado, el Grupo 1 (G1) tuvo una disminución poblacional a lo largo de los 10 días con una productividad celular de  $0,018 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{día}^{-1}$  evidenciando que las condiciones impuestas limitaron la acumulación de biomasa. Un caso similar

ocurrió con el Grupo 3, cuya productividad fue de solo  $0,002 \text{ g}\times\text{L}^{-1}\times\text{día}^{-1}$  con una tasa de crecimiento negativa de  $-0,188 \text{ día}^{-1}$  reflejando un severo efecto de inhibición sobre la población de *Dunaliella* sp, por motivo de que alcanzó la mitad de su valor inicial en aproximadamente 3,68 días (Tabla 2).

**Tabla 2.**

*Parámetros cinéticos del crecimiento microalgal durante la fase de estrés.*

	<b>N<sub>0</sub></b> <b>(cel/mL)</b>	<b>N<sub>f</sub></b> <b>(cel/mL)</b>	<b>PB</b> <b>(g×L<sup>-1</sup>×d<sup>-1</sup>)</b>	<b>Td</b>	<b>μ<sub>e</sub></b> <b>(día<sup>-1</sup>)</b>
<b>Control</b>	$1,78\times 10^6$	$2,75\times 10^6$	0,027	15,83	0,0438
<b>G1</b>	$1,50\times 10^6$	$6,00\times 10^5$	0,018	-7,56	-0,0916
<b>G2</b>	$2,25\times 10^6$	$6,73\times 10^6$	0,043	6,33	0,1095
<b>G3</b>	$1,98\times 10^6$	$3,00\times 10^5$	0,002	-3,67	-0,1885

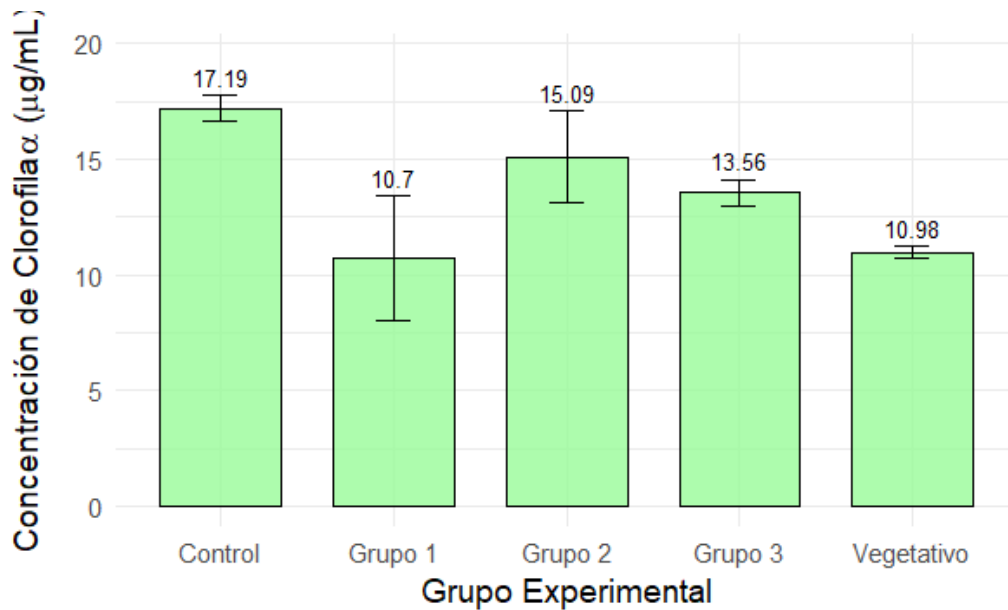
### 9.1.3 Producción de pigmentos fotosintéticos en *Dunaliella* sp. bajo condiciones estresantes

#### Producción de clorofila α

La composición bioquímica microalgal refleja mayor presencia de clorofila α en el grupo control, cuya concentración fue de  $17,19 \pm 0,56 \text{ }\mu\text{g/mL}$ . En contraste, el grupo 1 y vegetativo presentaron  $10,7 \pm 2,68 \text{ }\mu\text{g/mL}$  y  $10,98 \pm 0,24 \text{ }\mu\text{g/mL}$  respectivamente convirtiéndose en los grupos con menor producción de este compuesto, resultados que se atribuyen al aumento de la intensidad lumínica (Figura 11).

**Figura 11.**

*Concentración de clorofila  $\alpha$  en Dunaliella sp.*



**Nota:** Los valores representan la media  $\pm$  desviación ( $n=12$ ).

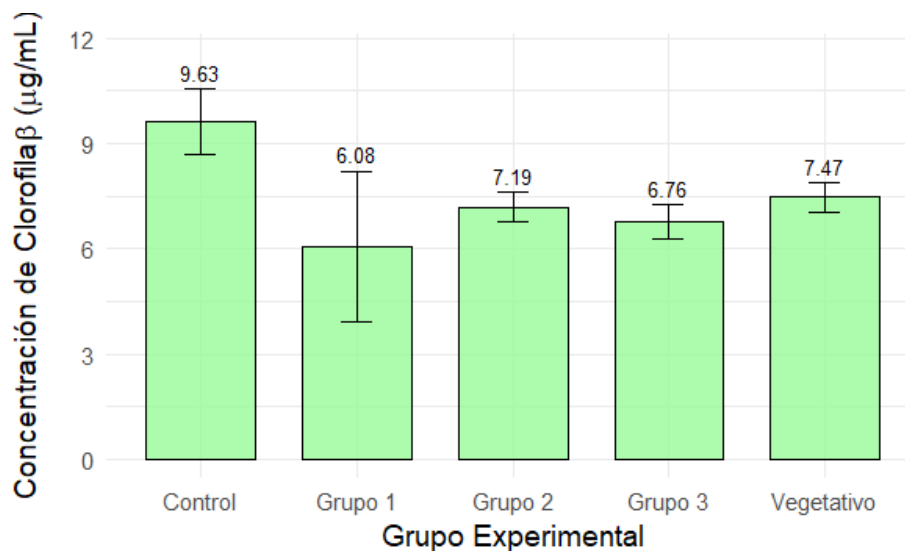
Dado que los resultados no cumplieron con los supuestos de normalidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis el cuál mostró un nivel de significancia de  $p = 2,56 \times 10^{-7}$ , lo que indica la existencia de diferencias altamente significativas entre las medianas de los grupos evaluados, confirmando que el aumento de la intensidad lumínica y la temperatura ejercieron un efecto diferencial sobre la concentración de clorofila  $\alpha$  en las distintas muestras; la prueba Dunn post-hoc con corrección de Bonferroni arrojó que el control presento diferencias con el grupo 1 ( $p= 4,59 \times 10^{-6}$ ) y el Vegetativo ( $5,43 \times 10^{-6}$ ) mientras que con el grupo 3 y el grupo 2 no presentó diferencias (0,013).

## Producción de clorofila $\beta$

La producción de clorofila  $\beta$  fue mayor en el grupo control porque alcanzó una concentración de  $9,63 \pm 0,92 \mu\text{g/mL}$  mientras que, los grupos con menor cantidad de este pigmento fueron el grupo 1 y el grupo 3 con  $6,08 \pm 2,14$  y  $6,76 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 12). Cabe recalcar que G1 mostró una desviación estándar relativamente alta, lo que sugiere una mayor variabilidad en las mediciones.

**Figura 12.**

*Concentración de clorofila  $\beta$  en Dunaliella sp.*



**Nota:** Los valores representan la media  $\pm$  desviación ( $n=12$ ).

El Kruskal–Wallis para los datos de clorofila  $\beta$  destacó la existencia de diferencias significativas con un valor de  $p = 2,91 \times 10^{-6}$ . La prueba post-hoc Dunn (Bonferroni) de igual manera que en Clorofila  $\alpha$  mostró que el control se diferencia

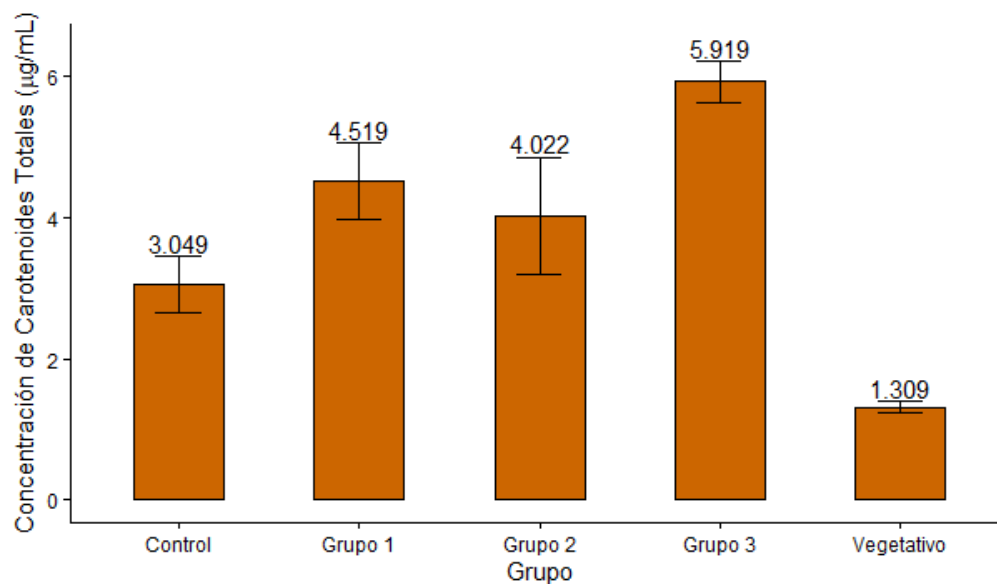
con grupo 1 ( $1,61 \times 10^{-5}$ ), con el grupo 2 (0,0036) y con el grupo 3 ( $1,71 \times 10^{-5}$ ) y no presenta diferencias estadísticamente significativas con vegetativo (0,095).

### Producción de carotenoides totales

A diferencia de los niveles de clorofila, el grupo con mayor concentración de carotenoides totales fue el Grupo 3 alcanzando un promedio de  $5,91 \pm 0,289 \mu\text{g/mL}$  seguido del G1 con  $4,51 \pm 0,539 \mu\text{g/mL}$ . En este sentido, se evidencia que los niveles de estrés inducido favorecieron significativamente la acumulación de carotenoides, el grupo control y el grupo vegetativo presentaron las concentraciones más bajas, con valores de  $3,05 \pm 0,395 \mu\text{g/mL}$  y  $1,31 \pm 0,085 \mu\text{g/mL}$ , correspondientemente (figura 13).

**Figura 13.**

*Concentración de carotenos totales en Dunaliella sp.*



**Nota:** Los valores representan la media  $\pm$  desviación ( $n=12$ ).

Se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk obteniendo que los datos no son normales. Debido a que no se cumplen los supuestos estadísticos se realizó las pruebas no paramétricas; como son la prueba Kruskal-Wallis y post hoc Dunn's con corrección Bonferroni.

De la prueba Kruskal-Wallis se obtuvo un valor  $p= 8,28 \times 10^{-10}$  reflejando diferencias significativas entre los 5 grupos analizados. La Prueba Post-Hoc de Dunn's con corrección Bonferroni mostró que todos los grupos experimentales diferían con el grupo vegetativo, destacando la mayor diferencia entre el G3 y Vegetativo ( $p=1,24 \times 10^{-7}$ ) siendo el primero notablemente superior. Por otro lado, no existieron diferencias ( $p= 1$ ) entre la concentración de carotenoides entre G1 y G2; del mismo modo control y vegetativo no presentaron diferencias significativas entre ellos ( $p=1$ ).

**Tabla 3.**

*Promedios de cantidad de clorofila  $\alpha$ ,  $\beta$  y carotenoides totales de Dunaliella sp. sometida a distintos tratamientos de estrés.*

Muestra	Clorofila $\alpha$	Clorofila $\beta$	Carotenoides totales ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\mu\text{g/mg}$ muestra	%	SD
Control	17,19	9,63	3,049	0,581	0,058	0,075
G1	10,7	6,08	4,519	0,861	0,086	0,103
G2	15,09	7,19	4,022	0,766	0,077	0,158
G3	13,56	6,76	5,918	1,127	0,113	0,055
VG	10,98	7,47	1,310	0,249	0,025	0,016

*Nota:*  $\mu\text{g/mL}$  es la cantidad de carotenoides por gramos de muestra, el % es el porcentaje que representa en total de biomasa seca.

## 9.2 Capacidad antioxidante de *Dunaliella sp.* bajo condiciones estresantes.

El grupo vegetativo (GV) registró los valores más bajos, con un promedio de  $149,78 \pm 3,61$   $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , lo que era esperado al corresponder a organismos en condiciones basales sin exposición al estrés. Mientras tanto, GC evidenció un ligero incremento con respecto a GV, produciendo en promedio  $166,24 \pm 2,09$   $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , lo que indica una estabilidad en la respuesta antioxidante bajo condiciones normales.

En los grupos que estaban bajos estrés, se vieron diferentes tendencias. El grupo 1 (G1), tuvo un aumento moderado de la capacidad antioxidante, con valores en el rango de  $162$ – $171$   $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ . Esto significa que la luz extra que recibieron estimuló una respuesta antioxidante sin generar un incremento drástico. Por su parte, el grupo 2 (G2), presentó resultados similares a G1, con valores entre  $166$ – $173$   $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , es decir, el factor térmico aislado también indujo un refuerzo de la actividad antioxidante comparable al del estrés lumínico.

Cabe destacar que, el efecto más notable se observó en el grupo 3 (G3), el cual alcanzó los valores más altos de capacidad antioxidante, situándose entre  $171$ – $185$   $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ . Dicho resultado sugiere un posible efecto sinérgico entre los factores de estrés, potenciando la síntesis de compuestos antioxidantes como mecanismo de defensa frente a condiciones adversas (Tabla 4).

**Tabla 4.**

*Promedios de parámetros espectrofotométricos y capacidad antioxidante de Dunaliella sp. sometida a distintos tratamientos de estrés.*

<b>Muestra</b>	<b>Abs</b>	<b>Abs neta</b>	<b>Conc. (µmol/l)</b>	<b>µmol Eq Trolox/g muestra</b>	<b>SD</b>	<b>%</b>
Control	0,35	0,39	506,49	166,24	2,09	52,79
Grupo 1	0,33	0,40	521,23	169,22	2,57	54,60
Grupo 2	0,34	0,40	516,32	168,35	2,57	54,00
Grupo 3	0,32	0,42	542,11	176,46	1,92	57,16
Vegetativa	0,39	0,35	459,82	149,78	3,61	47,06

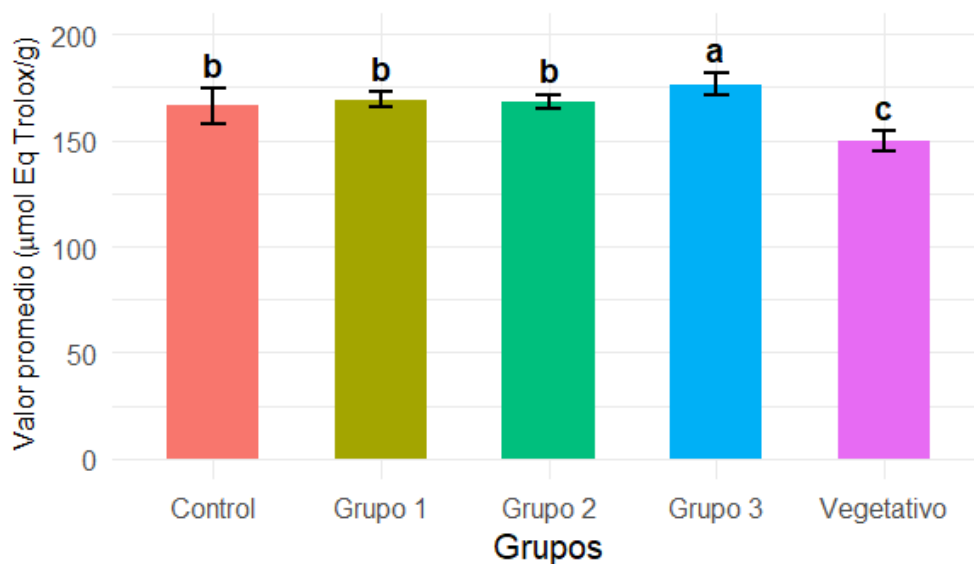
Se evaluaron los supuestos previos al análisis de varianza: La prueba de Shapiro Wilk indicó que los datos de los grupos presentan una distribución normal  $p= 0,1685$  ( $p > 0,05$ ). Asimismo, la prueba de Levene mostró homogeneidad de varianzas entre tratamientos ( $p = 0,136$ ). Por lo tanto, los datos cumplen los criterios para la aplicación de un ANOVA de una vía.

El ANOVA mostró diferencias significativas en la capacidad antioxidante entre tratamientos ( $F(4,37) = 23,46$ ,  $p < 0,0001$ ). El grupo vegetativo presentó valores significativamente menores que el control y los grupos estresados ( $p < 0,0001$ ). Se realizó la prueba Post-Hoc (Tukey HSD) y no se encontraron diferencias entre el control, G1 y G2 ( $p = 0,9969$ ). En cambio, G3 registró la mayor

capacidad antioxidante, siendo superior al control ( $p = 0,002$ ), a G1 ( $p = 0,047$ ) y a G2 ( $p = 0,020$ ) (Figura 12).

**Figura 14.**

*Capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol Eq Trolox/g muestra}$ )*



*Nota:* Las barras representan la media  $\pm$  DE ( $n = 9$ ). Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de una vía, seguido de prueba post hoc de Tukey,  $p < 0,05$ ).

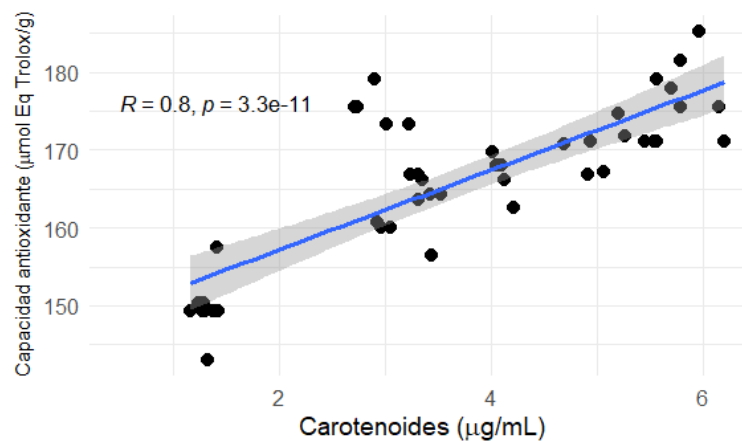
### **9.2.1 Correlación de Pearson de carotenoides totales con capacidad antioxidante**

Se realizó un análisis de correlación de rangos de Pearson para evaluar la relación que existe entre la concentración de carotenoides totales y la capacidad antioxidante, utilizando el conjunto de muestras.

Antes de realizar la prueba de correlación, se determinaron los supuestos estadísticos, revelando una linealidad en la dispersión y homocedasticidad en los residuales. El análisis estadístico reveló una correlación positiva y estadísticamente significativa ( $r= 0,80$ ;  $p= 3,3 \times 10^{-11}$ ); por lo tanto, se sugiere que a mayor cantidad de carotenoides la capacidad antioxidante incrementa (Figura 13).

**Figura 15.**

Correlación entre carotenoides totales y capacidad antioxidante.



*Nota:* Cada punto negro representa una muestra individual, la línea azul es el ajuste del modelo de regresión lineal y la banda gris alrededor de la línea indica el intervalo de confianza al 95 % del ajuste.

### 9.3. Comparación de la capacidad antioxidante con otras muestras.

Para comparar, se realizó un análisis usando ácido ascórbico puro obteniendo un valor de 92560,9 µmol equivalente Trolox/g. Sin embargo, debido a que la muestra de Vitamina C corresponde a un extracto puro no es posible comparar dichos resultados con el extracto biológico crudo, por tal razón, con el fin de establecer una referencia adecuada, se llevó a cabo una comparativa con literatura científica.

Como se muestra en la Tabla 3, los valores del grupo control fueron de 166,24  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , similares a los reportados por Belghith, et al, (2016) con 170  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , lo que evidencia una capacidad antioxidante comparable bajo condiciones no estresantes. Por otra parte, el Grupo 3 alcanzó una concentración de 176,46  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , dentro del rango descrito por Pais, et al, (2024) con 223,97  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$ , indicando una respuesta antioxidante elevada asociada a las condiciones de estrés aplicadas.

En contraste, los valores obtenidos por Ferreira, et al, (2023) y Andriopoulos, et al, (2022) fueron considerablemente menores, los extractos acuosos empleados en dichos estudios presentaron concentraciones inferiores incluso al Grupo Vegetativo del presente trabajo, con 149,78  $\mu\text{mol Eq Trolox/g}$  (Tabla 5).

**Tabla 5.**

*Capacidad antioxidante de Dunaliella sp. en distintos contextos experimentales y estudios previos*

<b>Fuente</b>	<b>Muestra</b>	<b>Fracción/Contexto</b>	<b>Cap. Antioxidante (μmol TE/g)</b>
<b>(Lin, y otros, 2017)</b>	<i>D. salina</i>	Carotenoides (Extracto)	760,0
<b>(Belghith, Athmouni, Bellassoued, Feki, &amp; Ayadi, 2016)</b>	<i>D. salina</i>	Estrés por Cadmio (Alto estrés)	440,0
<b>(Pais, y otros, 2024)</b>	<i>D. salina</i>	Extracto Lipídico	223,97
<b>(Belghith, Athmouni, Bellassoued, Feki, &amp; Ayadi, 2016)</b>	<i>D. salina</i>	Control (sin estrés)	170,0
<b>(Andriopoulos, y otros, 2022)</b>	<i>D. salina</i>	Extracto Acuoso (Polifenoles)	5,27
<b>(Ferreira, y otros, 2023)</b>	<i>D. salina</i>	Extracto Acuoso (Polifenoles)	4,15

## 10.DISCUSIONES

Al culminar la fase experimental, el grupo control alcanzó una concentración celular promedio de  $2,75 \times 10^6$  cel/mL, similar al reportado por Abu-Rezq, et al., (2010) quienes obtuvieron  $2,3 \times 10^6$  cel/mL bajo las mismas condiciones de temperatura de  $23^\circ\text{C}$  y a  $250 \mu\text{M}/\text{sm}^2$ . La aplicación exclusiva de estrés lumínico en el grupo 1 produjo una densidad significativamente menor ( $6 \times 10^5$  cel/mL), inferior tanto al grupo control como al grupo sometido a estrés térmico. Este resultado concuerda con Wu, Duangmanee, Zhao, Juntawong, & Ma (2016) quienes demostraron que niveles de irradiancia superiores al óptimo pueden dañar la estructura celular y restringir el crecimiento. Sin embargo, difiere de los señalado por Scheliga, Nepomuceno, Ribeiro, & Teixeira (2024), quienes aseguran que una mayor intensidad lumínica favorece la tasa de crecimiento, alcanzando densidades de hasta  $4,6 \times 10^6$  cel/mL.

Por su parte, el aumento de temperatura a  $28^\circ\text{C}$  en el Grupo 2, generó una densidad celular superior ( $6,73 \times 10^6$  cel/mL) y mayor productividad, sugiriendo que un leve incremento térmico estimula el metabolismo sintético de las células. Al respecto, Uttan, Nielsen & Milledge, (2021) indican que, *Dunaliella* consigue densidades máximas entre  $0,3 \times 10^6$ –  $2,4 \times 10^6$  cel/mL cuando la temperatura fluctúa entre  $10^\circ\text{C}$  y  $30^\circ\text{C}$ , de modo que el cambio de  $23^\circ\text{C}$  a  $28^\circ\text{C}$  en G2 estuvo dentro del rango de tolerancia y activó la división celular respecto al control.

Asimismo, Seepratoomrosh, et al., (2016) observaron que la combinación de alta temperatura e irradiancia provocó una fotoinhibición más grave reduciendo las tasas de crecimiento por debajo de las obtenidas bajo un solo factor de estrés. Esto se evidenció en cultivos de *D. tertiolecta* expuestos a 30, 35 y 40 °C y 500-2000  $\mu$ fotones mol  $m^{-2}s^{-1}$ . En concordancia, el grupo 3 registró la menor densidad ( $3 \times 10^5$  cel/mL) confirmando que la interacción entre ambos estresores limita el crecimiento, puesto que, la energía se desvía a la síntesis de pigmentos protectores en lugar de la multiplicación celular (Santos, Cabecinha, Gago, Monteiro, & AnaLuzio, 2025).

Dicha respuesta fisiológica se reflejó en el contenido de clorofila  $\alpha$ , que fue mayor en el grupo control (17,19  $\mu$ g/mL) y menor en el grupo 1 (10,07  $\mu$ g/mL). Según Gao, Bernard, Fanesi, Perré, & Lopes, (2024), las microalgas desarrollan mecanismos fotoprotectores frente a la luz intensa, reduciendo rápidamente la concentración de clorofila-a para prevenir el fotodaño y mantener la viabilidad celular.

En general, los rangos de clorofila  $\alpha$  obtenidos en este estudio (10,7 a 17,2  $\mu$ g/mL) coinciden con los registrados por Jalilul, Jeva, Sarri, Robles, & Jamil (2025), quienes reportaron concentraciones de 8,63 a 15,92  $\mu$ g/mL en microalgas verdes bajo diferentes intensidades lumínicas. En contraste, Minhas, Gaur, & Adholeya (2023), informaron sobre valores considerablemente más altos (hasta

32,23  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en *D. tertiolecta* cultivada a 120 y 250  $\mu\text{M}/\text{s}\cdot\text{m}^2$ ), lo cual demuestra que la respuesta pigmentaria varía notablemente entre especies y depende estrechamente de las condiciones de cultivo, incluyendo el medio, el fotoperiodo y el tipo e intensidad del estrés que se aplique.

En cuanto a la concentración de clorofila  $\beta$  los valores siguieron una tendencia similar, el control presentó la mayor concentración ( $9,63 \pm 0,92 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) seguido del grupo vegetativo ( $7,5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Este patrón se alinea con los resultados del estudio de Minhas, Gaur, & Adholeya (2023) quienes observaron sensibilidad de la clorofila  $\beta$  frente a variaciones ambientales. A pesar de ello, parece contrastar con lo hallado por Belghith, et al (2016), quienes reportaron un aumento de hasta  $48,5 \mu\text{g}/\text{mL}$  de clorofila  $\beta$  en cultivos en *D. salina* sometidos a altas salinidades. Este hallazgo sugiere que distintos tipos de estresores ambientales pueden activar rutas metabólicas específicas, es decir, mientras la alta intensidad lumínica se asocia a la producción de compuestos secundarios como los antioxidantes, otros estresores pueden inducir la producción de glicerol (Tafresh & Shariati, 2008).

A su vez, el aumento de la clorofila  $\beta$  en el grupo vegetativo en comparación con los otros grupos podría atribuirse a la mayor proporción de células jóvenes presentes. Este comportamiento coincide con lo expuesto por Belghith, et al., (2016) quienes documentaron un aumento de  $22,3 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$  durante la fase exponencial a  $48,51 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{mL}$  en su fase de declive, demostrando que la

cantidad de pigmento se encuentra fuertemente relacionada a la etapa de crecimiento y al estado fisiológico del cultivo.

La mayor concentración de carotenoides totales se obtuvo en el grupo 3 ( $5,92 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ ). De forma concordante, Pisal & Lele (2005) reportaron un incremento significativo en la acumulación de  $\beta$ -caroteno al cultivar células bajo  $400 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Ambos estudios demuestran que la interacción entre temperatura e intensidad lumínica potencia la ruta biosintética de los carotenoides.

El grupo 2, mostró un aumento en la concentración de carotenoides ( $4,002 \mu\text{g/mL}$ ) respecto al control, lo que confirma que la temperatura, de manera aislada, ejerce un efecto positivo sobre la carotenogénesis, aunque los resultados siguen sin superar los valores obtenidos bajo estrés lumínico o combinado. Esto contrasta con lo señalado por GÓMEZ & GonzalGómez & Gonzalez, (2005) quien afirma que la temperatura constituye el factor más determinante en la composición y el contenido de carotenoides, superando incluso la influencia de la irradiancia. En consecuencia, la alta intensidad de la luz fue adecuada para la biosíntesis de carotenoides, pero fue desventajosa para el crecimiento de las algas Lamers et al., (2010).

En oposición, el grupo GV presentó la menor concentración ( $1,31 \pm 0,016$   $\mu\text{g/mL}$ ), aunque este valor supera el reportado por Ibrahim et al. (2021) en condiciones basales ( $0,67$   $\mu\text{g/mL}$ ). Cabe destacar que no todas las cepas responden al estrés aumentando su cantidad de carotenoides, Ak, Cirik, & Göksan (2008) descubrieron una disminución de estos pigmentos al aumentar la intensidad lumínica, mientras que Ibrahim, Matloub, El-Sayed, F., & Abdelsamiae (2021) observaron reducciones ( $1,30$ - $1,50$   $\mu\text{g/mL}$ ) en condiciones de alta salinidad.

El análisis de la capacidad antioxidante mediante la técnica DPPH evidenció que el estrés combinado (G3) produjo el incremento más notable de la concentración de antioxidantes ( $176,46$   $\mu\text{mol TE/g}$ ), significativamente superior al resto de los grupos experimentales ( $p < 0,05$ ). Este comportamiento afirma que la combinación de estresores produce una respuesta sinérgica en la síntesis de compuestos antioxidantes. De hecho, estudios previos señalan que la irradiancia y la temperatura elevadas amplifican la síntesis de moléculas antioxidantes en microalgas, actuando como mecanismos de defensa para detener o retrasar el daño oxidativo provocado por el exceso de energía en el aparato fotosintético Coulombier, Jauffrais, & Lebouvier, (2021).

Sin embargo, es importante detallar el mecanismo biológico subyacente; debido a que el aumento en la Capacidad Antioxidante se atribuye a la acumulación estratégica de pigmentos fotoprotectores y compuestos fenólicos. Frente al estrés

oxidativo celular generado por los tratamientos, la microalga sobreproduce estos metabolitos secundarios que actúan neutralizando las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS). Químicamente, la estructura poliénica de los carotenoides acumulados facilita la donación de electrones al radical libre DPPH, lo que resulta en los altos valores de inhibición observados en el grupo G3.

Sansone & Brunet, (2019) declaran que la capacidad antioxidante de microalgas presenta una variabilidad muy amplia, que puede oscilar entre 4 y los 260  $\mu\text{mol TE/g}$ , está dependerá de la especie estudiada y las condiciones ambientales a la que sea sometida. Esto coincide con Guajardo-Barbosa, et al., (2017) donde se estudió la respuesta de *Haematococcus pluvialis* frente al estrés salino y obtuvieron una concentración de antioxidante promedio de  $105,2 \pm 1,8$   $\mu\text{mol TE/g}$ , siendo este valor inferior a la concentración de antioxidante producida en G1 y G3. Al respecto, Coulombier, Jauffrais, et al.,(2021) indican que los compuestos antioxidantes se producen para contrarrestar compuestos generados en el aparato fotosintético por un exceso de energía.

El grupo GV fue el que menor concentración presentó (149,78  $\mu\text{mol TE/g}$ ), aun así, es un valor más alto a lo reportado en otras microalgas. Por ejemplo, Bulut, Köse, Sönmez, & Öktem, (2024) consiguieron una concentración de  $7,72 \pm 0,95$   $\mu\text{mol TE/g}$  en muestras de *Micractinium sp.*, siendo extremadamente baja,

significando que la cepa utilizada en el estudio no presenta capacidad en la producción de compuesto antioxidantes.

La alta concentración de compuestos antioxidantes reportadas en el análisis DPPH puede deberse al método utilizado para la extracción, es decir, el uso combinado de metanol y cloroformo resulta ser eficiente para extraer moléculas tanto polares como apolares a diferencia de otros solventes comúnmente utilizados. Bulut, Köse, Sönmez, & Öktem, (2024) utilizaron diferentes tipos de solventes, pero se obtienen cantidades bajas ( $11,54 \pm 30,40 \mu\text{mol TE/g}$ ); del mismo modo Carrillo & Anchundia, (2024) emplearon un extracto acuoso (se usó agua como solvente) en muestra de *Dunaliella salina* y extrajeron  $3,9 \mu\text{mol/g}$  en el análisis de DPPH. Del mismo modo en Amador, Herrero, Domínguez, & Ibáñez., (2024) en una cepa de *D. salina* utilizaron extracción supercrítica por alta presión obteniendo  $253 \pm 8 \mu\text{mol TE/g}$  similar a los resultados de G3.

Lo mencionando anteriormente es un indicativo de que la técnica que se utilizó afecta de manera considerable a la concentración de antioxidantes, debido a que los métodos intensificados permiten recuperar más compuestos lo que eleva la capacidad antioxidante por muestra. En síntesis, al usarse métodos que solo extraen compuestos específicos se obtienen valores menores como en Bulut, Köse, Sönmez, & Öktem, (2024).

## 11.CONCLUSIONES

La aplicación de los estresores de alta intensidad lumínica y temperatura lograron incrementar de manera significativa la biosíntesis de carotenoides totales en la cepa de *Dunaliella sp.*, donde resaltó el Grupo 3 presentando la mayor acumulación de estos pigmentos, lo que significa que ambos estresores tienen un efecto sinérgico en la ruta metabólica de carotenoide. Por otro lado, que los grupos basales presenten la menor cantidad de este pigmento.

El estrés aplicado a los cultivos no solo incrementó los carotenoides totales sino también la capacidad antioxidante, siendo el Grupo 3 el que obtuvo los valores más altos, presentando también una correlación fuerte y significativamente con la cantidad de carotenoides. Confirmando que la exposición simultánea de luz y temperatura favorece la producción de los metabolitos que se encuentran involucrados en la protección del aparato fotosintético ante el daño oxidativo.

Al comparar la capacidad antioxidante frente al referente ácido ascórbico, se determinó que el extracto de *Dunaliella sp.*, es menor, presentando una actividad aproximadamente 525 veces menor que el estándar puro. Esta diferencia es atribuible a que se contrastó un extracto crudo no purificado frente a un estándar analítico de alta pureza; sin embargo, la cepa supera a otros referentes algales de la literatura, validando su competitividad como fuente natural.

## 12.RECOMENDACIONES

Probar con diferentes solventes para observar con cual se obtiene mayor cantidad de pigmentos; además, adicionar una cuantificación de lípidos totales, proteínas y de otra técnica para identificación de carotenoides individuales como  $\beta$ -caroteno, luteína, etc., lo que va a mejorar la interpretación.

Complementar el análisis de DPPH con otros análisis como ABTS, FRAP o ORAC para una comparativa del potencial antioxidante, además analizar la producción de compuestos fenólicos para correlacionar su producción con su capacidad antioxidante.

Para instaurar una evaluación coherente y representativa del potencial biotecnológico, es imperativo realizar comparaciones con referentes biológicos, particularmente otros extractos algales. Esto permite contextualizar la bioactividad real de la cepa dentro de un marco de referencia equitativo, evitando las distorsiones derivadas de las diferencias de pureza.

### 13. BIBLIOGRAFÍAS

- Abu-Rezq, T. S., Al-Hooti, S., Jacob, D., Al-Shamali, M., AnwarAhmed, & Ahmed, N. (2010). Induction and extraction of  $\beta$ -carotene from the locally isolated *Dunaliella salina*. *J. Algal Biomass Utiln.*, 4(1x), 58-83.
- Aditi, Bhardwaj, R., Yadav, A., Swapnil, P., & Meena, M. (2025). Characterization of microalgal  $\beta$ -carotene and astaxanthin: exploring their health-promoting properties under the effect of salinity and light intensity. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. Obtenido de <https://biotechnologyforbiofuels.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13068-025-02612-x#:~:text=chloroplasts%20due%20to%20high%20light,photochemical%20quenching%20%5B45>
- Ak, İ., Cirik, S., & Göksan, T. (2008). Effects of Light Intensity, Salinity and Temperature on Growth in Çamaltı Strain of *Dunaliella viridis* Teodoresco from Turkey. *Journal of Biological Sciences*, 8(8), 1356-1359, .
- Amador-Luna, V. M., Herrero, M., Domínguez-Rodríguez, G., & Ibáñez., E. (2024). Enhancing the bioactivity of *Dunaliella salina* extracts through ultra-high pressure supercritical fluid extraction (UHP-SFE). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 95(103697). Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2024.103697>
- Andriopoulos, V., Gkioni, M. D., Koutra, E., Mastropetros, S. G., Lamari, F. N., Hatziantoniou, S., & MichaelKornaros. (4 de July de 2022). Total Phenolic

Content, Biomass Composition, and Antioxidant Activity of Selected Marine Microalgal Species with Potential as Aquaculture Feed.

*Antioxidants*, 11, 1320. doi:<https://doi.org/10.3390/antiox11071320>

Barbosa, M., Inácio, L. G., Afonso, C., & Maranhão, P. (2023). The microalga

*Dunaliella* and its applications: a review. *Applied Phycology*, 99-120.

doi:10.1080/26388081.2023.2222318

Belghith, T., Athmouni, K., Bellassoued, K., Feki, A. E., & Ayadi, H. (2016).

Physiological and biochemical response of *Dunaliella salina* to cadmium pollution. (B. Whintton, Ed.) *Journal of Applied Phycology*, 28(2), 991–

999. doi:10.1007/s10811-015-0630-5

Belghith, T., Athmouni, K., Elloumi, J., Guermazi, W., Stoeck, T., & Ayadi, H.

(23 de July de 2016). Biochemical Biomarkers in the Halophilic

Nanophytoplankton: *Dunaliella salina* Isolated from the Saline of Sfax

(Tunisia). *Arab J Sci Eng*, 41, 17-24. doi: DOI 10.1007/s13369-015-1808-

5

Borowitzka, M. A., & Siva, C. J. (27 de Abril de 2007). The taxonomy of the

genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine and halophilic species. *J Appl Phycol*, 19, 567-590.

doi:10.1007/s10811-007-9171-x

Bulut, O., Köse, I. E., Sönmez, Ç., & Öktem, H. A. (2024). Antioxidant activity of

*Micractinium* sp. (Chlorophyta) extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative

stress in human breast adenocarcinoma cells. *Scientific Reports*, 14(27593). Obtenido de <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63960-6>

Carrillo, M., & Anchundia, M. (2024). “Antimicrobial and antioxidant capacity of *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* and their potential use in food.” a systematic review. *CABI Agriculture and Bioscience*, 5(108). Obtenido de <https://cabiagbio.biomedcentral.com/articles/10.1186/s43170-024-00316-0>

Casella, P., Iovine, A., Mehariya, S., Marino, T., Musmarra, D., & Molino, A. (2020). Smart Method for Carotenoids Characterization in *Haematococcus pluvialis* Red Phase and Evaluation of Astaxanthin Thermal Stability. *Antioxidants (Basel)*. doi:Antioxidants (Basel)

Coulombier, N., Jauffrais, T., & Lebouvier, N. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Mar Drugs*, 19(10). Obtenido de <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8537667/#:~:text=produced%20by%20microalgae%20are%20used,41%2C23%20%2C%2043%2C25%20%2C%2045>

Coulombier, N., Jauffrais, T., & NicolasLebouvier. (2021). Antioxidant Compounds from Microalgae: A Review. *Mar. Drugs*, 19, 549. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/md19100549>

Cruz, M. d. (2017). *El estrés abiótico en el metabolismo del nitrógeno y en el sistema antioxidante de la microalga acidófila*. Universidad de Huelva . Obtenido de

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=234262#:~:text=Las%20variables%20m%C3%A1s%20importantes%20que,aproximadamente%20%2C5%29%20y%20en>

Fernández, D. R., Flórez, N. A., Buitrago, L. A., & Baquero, C. E. (2017).

Aspectos teóricos de la extracción de carotenoides a partir de microalgas. *Semilleros Formación Investigativa*, 3(1), 35-48. Obtenido de <https://repository.uamerica.edu.co/server/api/core/bitstreams/274486e0-5431-4091-9b81-3e1f9355b38d/content>

Ferreira, J. P., Grácio, M., Sousa, I., Pagarete, A., Nunes, M. C., & Raymundo., A.

(27 de August de 2023). Tuning the Bioactive Properties of *Dunaliella salina* Water Extracts by Ultrasound-Assisted Extraction. (D. Herminia, M. D. Torres, & N. Flórez-Fernández, Edits.) *Marine Drugs*. doi:<https://doi.org/10.3390/md21090472>

Gao, Y., Bernard, O., Fanesi, A., Perré, P., & Lopes, F. (2024). The effect of light

intensity on microalgae biofilm structures and physiology under continuous illumination. *Scientific Reports*, 14(1151). Obtenido de <https://www.nature.com/articles/s41598-023-50432-6#citeas>

García Morales, J., López Elías, J. A., Medina Félix, D., García Lagunas, N., &

Fimbres Olivarría, D. (2020). Effect of nitrogen and salinity stress on the  $\beta$ -carotene content of the microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Biotecnia*, 22(2). doi:<https://doi.org/10.18633/>

- García-Romeral, J., Pavía-Gómez, M., Sanz, T. G., Chirivella-Martorell, J., & Serrano-Aroca, Á. (Diciembre de 2017). Principios de Biotecnología y Bioingeniería en el cultivo de microalgas: importancia, problemas tecnológicos, tipos y sistemas de cultivos, crecimiento, factores limitantes, selección, aislamiento, escalado y caracterización bioquímica. *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 115-129. doi:1888-8550
- GÓMEZ, P. I., & GONZÁLEZ, M. A. (2005). The effect of temperature and irradiance on the growth and carotenogenic capacity of seven strains of *Dunaliella salina* (Chlorophyta) cultivated under laboratory conditions. *Biol Res*(38), 151-162. doi:<https://doi.org/10.4067/S0716-97602005000200005>
- Guajardo-Barbosa, C., Beltrán-Rocha, J. C., Mora-Zúñiga, A. E., Gallegos-López, J. A., López, U. J., Wong, L. J., . . . Elías-Santos, M. (2017). Evaluación de la actividad antioxidante de los carotenoides totales producidos por la microalga *Haematococcus pluvialis* bajo distintos periodos de estrés. *IV Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina II Simposio Nacional de Microbiología Aplicada*, (pág. 28). Nuevo Leon . Obtenido de <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/24504>
- Guevara, M., Pinto, R., Villarroel, J., Hernández, E., Díaz, R., Gotera, B., & Cortez, R. (2016). Influence of salinity and irradiance on growth and

biochemical composition of a new strain of *Dunaliella salina* from the Araya salt works, Venezuela. *Saber*, 28(3). doi:ISSN 2343-6468

Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. (junio de 2013). Microalgae taxonomy and breeding. *Department of biotechnology, Indian Institute of Technology Madras, India*, 44-53. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/286617872\\_Microalgae\\_taxonomy\\_and\\_breeding](https://www.researchgate.net/publication/286617872_Microalgae_taxonomy_and_breeding)

Henríquez, V., Escobar, C., Galarza, J., & Gimpel, J. (03 de August de 2016). Carotenoids in Microalgae. In: Stange, C. (eds) Carotenoids in Nature. Subcellular Biochemistry. *Springer, Cham*, 79. doi:[https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39126-7_8)

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*. Obtenido de [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-19572014000200001#:~:text=La%20intensidad%20lum%C3%ADnica%20es%20uno,2011a](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-19572014000200001#:~:text=La%20intensidad%20lum%C3%ADnica%20es%20uno,2011a)

Ibrahim, N. A., Matloub, A. A., El-Sayed, A. E.-K., F., H., & Abdelsamiae, A. S. (2021). Phytochemical and Biological Studies of Carotenoids in Some Microalgae (*Dunaliella salina*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina platensis*). *Egyptian Journal of Chemistry*, 64(5), 2343 - 2353. doi:10.21608/EJCHEM.2021.60663.3306

- Jalilul, J.-N. M., Jeva, M. A., Sarri, J. H., Robles, R. J., & Jamil, W. M. (27 de September de 2025). Evaluation of AMPEP as a Natural Biostimulant for Enhancing Biomass and Pigment Yield in *Chlorella sorokiniana*. *JURNAL ILMIAH PERIKANAN DAN KELAUTAN*, 17(3), 724-735. doi: e-ISSN:2528-0759; p-ISSN:2085-5842
- Jin, G., Liu, Y., Xue, S., Meng, Y., Yan, J., Yang, F., . . . Liang, X. (2019). Determination of Three Carotenoids in Microalgae by Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 1593- 1601.
- Lafarga, T., Clemente, I., & Garcia-Vaquero, M. (2020). 5 - Carotenoids from microalgae. (C. M. Galanakis, Ed.) *Science Direct*, 149-187. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/C2018-0-00646-5>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschman, C. (01 de November de 2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols*, 1, F4.3.1-F4.3.8. doi:<https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0403s01>
- Lin, H.-W., Liu, C.-W., Yang, D.-J., Chen, C.-C., Chen, S.-Y., Tseng, J.-K., . . . Chang., Y.-Y. (2017). *Dunaliella salina* alga extract inhibits the production of interleukin-6, nitric oxide, and reactive oxygen species by regulating nuclear factor-kB/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription in virus-infected RAW264.7 cells. *journal of food and*

*druganalysis*, 25(4), 908-918. Obtenido de

<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.11.018>

Luna, L. M. (2007). MICROALGAS: ASPECTOS ECOLÓGICOS Y BIOTECNOLÓGICOS. *Revista Cubana de Química*, XIX(2), 3-20.

Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>

Macías-Sánchez, M., C. Mantell, M. R., Ossa, E. M., Lubian, L., & Montero, O.

(15 de January de 2009). Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta*, 77(3), 948-952.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.07.032>

Minhas, A. K., Gaur, S., & Adholeya, A. (2023). Influence of light intensity and photoperiod on the pigment and, lipid production of *Dunaliella tertiolecta* and *Nannochloropsis oculata* under three different culture medium .

*Heliyon*, 9(2). Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12801>

Morón-Ortiz, Á., Mapelli-Brahm, P., & Meléndez-Martínez, A. J. (febrero de 2024). Sustainable Green Extraction of Carotenoid Pigments: Innovative Technologies and Bio-Based Solvents. *Antioxidants (Basel)*. Obtenido de [10.3390/antiox13020239](https://doi.org/10.3390/antiox13020239)

Murata, N., Takahashi, S., Nishiyama, Y., & Allakhverdiev., S. I. (2007).

Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. *Science Direct* , 414–421. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.11.019>

Oren, A. (January de 2010). THE ALGA *DUNALIELLA*. BIODIVERSITY, PHYSIOLOGY, GENOMICS AND BIOTECHNOLOGY. *ournal of Biological Research-Thessaloniki*, 46, 216-217.

doi:<https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2009.00785.x>

Pais, R., Conde, T., Neves, B. B., Pinho, M., Coelho, M., Pereira, H., . . .

Tânia Melo. (19 de October de 2024). Bioactive Lipids in *Dunaliella salina*: Implications for Functional Foods and Health. *Foods*, 13, 3321.

Obtenido de <https://doi.org/10.3390/foods13203321>

Pisal, D. S., & Lele, S. S. (october de 2005). Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*. *Indian Journal of Biotechnology* , 4, 476-483.

Ría , A., Rahmani Akmal, W., & Agus Suyono, E. (2023). Enhancement of Astaxanthin Content in Mixed Culture of *Dunaliella sp.* and *Azospirillum sp.* under Light Intensity Treatment. *JIPK (JURNAL ILMIAH PERIKANAN DAN KELAUTAN)*, 15(2), 430-437. Obtenido de <http://doi.org/10.20473/jipk.v15i2.38596>

Rowland, S. M., Stefanie, V. W., & Laurens, L. M. (2022). *Identification and Quantification of Photosynthetic Pigments in Algae (Laboratory Analytical Procedure (LAP))*. U.S. Department of Energy Office of Scientific and Technical Information. Golden : CO: National Renewable Energy Laboratory. . doi:<https://doi.org/10.2172/1896813>



F%2FwEaCXVzLWVhc3QtMSJHMEUCIQCWjICCpa6VTHS22faPN84  
%2BV0yYiU%2BpKUeA4O

Shaikh, R., Rizvi, A., Pandit, S., Desai, N., & Patil, R. (2022). Chapter 21 -  
Microalgae: Classification, bioactives, medicinal properties, industrial  
applications, and future prospectives. (M. Shah, S. Rodriguez-Couto, C. B.  
Cruz, & J. Biswas, Edits.) *Elsevier*, 451-486.  
doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823499-0.00004-3>

Tafresh, A. H., & Shariati, M. (October de 2008). Dunaliella biotechnology:  
methods and applications. *Journal of Applied Microbiology*, 14–35.  
doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x

Uttan Kumer, R., Vejby Nielsen , B., & James Milledge , J. (2021). Antioxidant  
Production in *Dunaliella*. *Applied Sciences*, 11(9). Obtenido de  
<https://www.mdpi.com/2076-3417/11/9/3959#:~:text=Dunaliella%20can%20grow%20phototrophically%20at,in%20a%20high%20saline%20medium>

Wu, Z., Duangmanee, P., Zhao, P., Juntawong, N., & Ma, C. (s.f.). The Effects of  
Light, Temperature, and Nutrition on Growth and Pigment Accumulation  
of Three *Dunaliella salina* Strains Isolated from Saline Soil. *Jundishapur J  
Microbiol.* . doi:10.5812/jjm.26732

Zepeda Lupio, E. (2017). *Crecimiento e inducción a la carotenogénesis de la  
microalga Dunaliella sp. en diferentes condiciones de cultivo*. Tesis de  
postgrado, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de

Ensenada, Baja California . Obtenido de

<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/1261/3/TESSIS%20FINAL%20COMPLETA%20Enrique%20Zepeda.pdf>

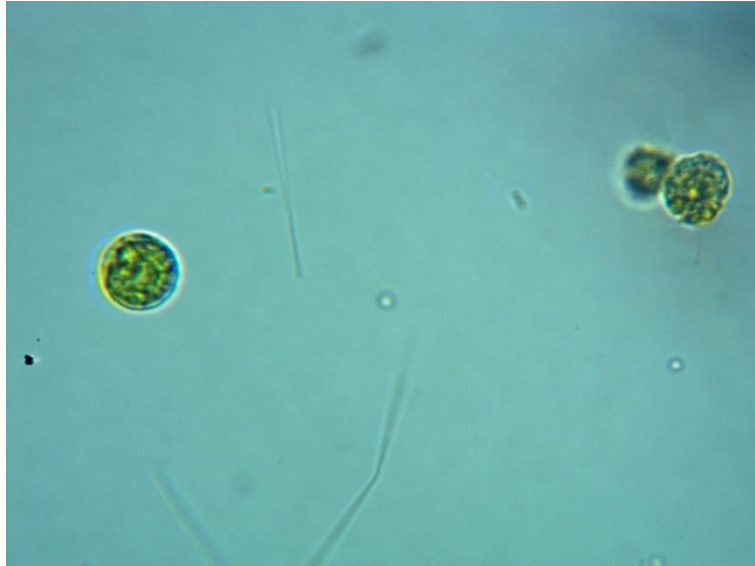
Zheng, D., Zou, L., Zou, J., Li, Q., & Lu, S. (Abril de 2024). Refining taxonomic identification of microalgae through molecular and genetic evolution: a case study of *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum arenarium*.

*Microbiology Spectrum* . doi:<https://doi.org/10.1128/spectrum.02367-23>

## 14. ANEXOS

### Anexo 1.

*Celulas de Dunaliella sp. vistas en un microscopio a 40x.*



### Anexo 2.

*Escalamiento a cultivos en 3 litros.*



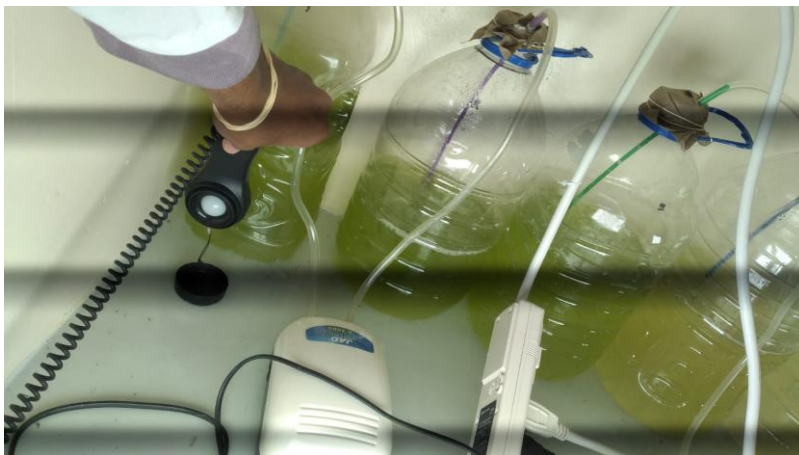
**Anexo 3.**

*Cultivos de 150 mL utilizados en la curva de crecimiento.*



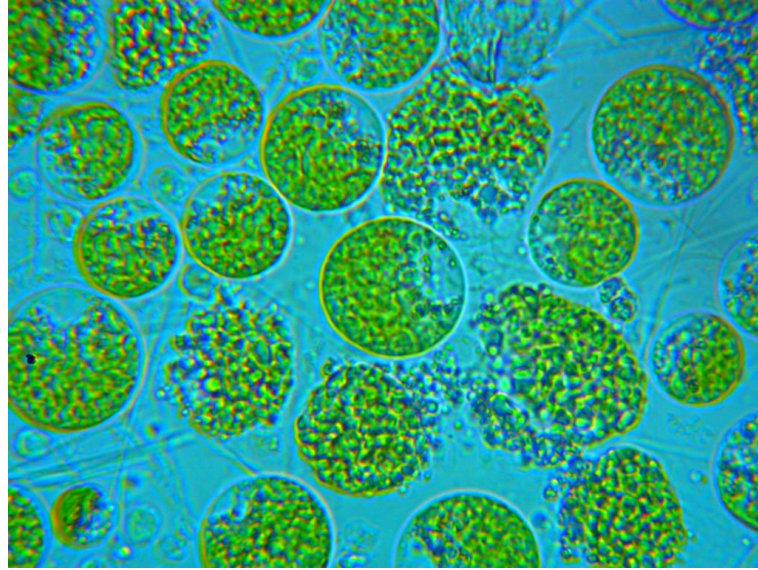
**Anexo 4.**

*Toma de intensidad luminica durante la fase de estrés.*



**Anexo 5.**

*Celulas de Dunaliella sp. pertenecientes al Grupo 1.*



**Anexo 6.**

*Biomasa seca de cultivo perteneciente al control.*



**Anexo 7.**

*Biomasa residual de la extracción de carotenoides.*



**Anexo 8.**

*Extracto de la Capacidad antioxidante de las muestras de Dunaliella sp.*



**Anexo 9.**

*Solución Stock del Reactivo DPPH.*



**Anexo 10.**

*Puntos para realizar la Curva estandar de Trolox.*



**Anexo 11.**

*Datos de carotenoides totales.*

<b>MUES TRA</b>	<b>AB S 665 .2</b>	<b>ABS 652.4</b>	<b>ABS 470</b>	<b>Cloro fila <math>\alpha</math></b>	<b>Cloro fila <math>\beta</math></b>	<b>Carotenoides totales (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>F D</b>	<b><math>\mu\text{g/mg}</math> muestra</b>
<b>Contr ol 1</b>	0,1 99	0,12	0,20 9	2,233 58	1,138 94	3,426	8	0,65
	0,1 97	0,118	0,20 8	2,218 5	1,098 18	3,530	8	0,67
	0,1 93	0,12	0,20 4	2,132 66	1,238 18	2,920	8	0,56
	0,1 91	0,12	0,20 2	2,099 02	1,271 26	2,739	8	0,52
<b>Contr ol 2</b>	0,1 93	0,122	0,20 5	2,114 1	1,312 02	2,707	8	0,52
	0,2 02	0,127	0,21 4	2,219 08	1,347 76	2,899	8	0,55
	0,1 86	0,113	0,19 4	2,079 88	1,095 52	3,050	8	0,58
	0,1 99	0,121	0,21 3	2,224 3	1,175 86	3,444	8	0,66
<b>Contr ol 3</b>	0,1 88	0,116	0,19 9	2,085 68	1,173 2	2,965	8	0,56
	0,1 83	0,112	0,19 6	2,038 7	1,108 22	3,081	8	0,59
	0,1 95	0,126	0,20 3	2,110 62	1,426 62	2,248	8	0,43
	0,1 97	0,117	0,20 6	2,227 78	1,061 26	3,583	8	0,68
<b>Grupo 1.1</b>	0,1 66	0,105	0,25	1,82	1,131	4,939	8	0,94
	0,1 62	0,102	0,26	1,778 28	1,086 36	5,448	8	1,04
	0,1 63	0,103	0,25 5	1,785 82	1,106 74	5,201	8	0,99
	0,1 61	0,101	0,25 3	1,770 74	1,065 98	5,269	8	1,00
<b>Grupo 1.2</b>	0,0 9	0,052	0,15 7	1,031 24	0,431 24	4,053	8	0,77
	0,0 87	0,05	0,15 6	0,999 34	0,407 02	4,102	8	0,78
	0,1 03	0,066	0,18 8	1,119 98	0,733 1	4,128	8	0,79
	0,1 03	0,063	0,18	1,147 82	0,622 34	4,217	8	0,80

<b>Grupo 1.3</b>	0,105	0,066	0,182	1,15362	0,70002	4,025	8	0,77
	0,104	0,065	0,183	1,14608	0,67964	4,130	8	0,79
	0,103	0,063	0,18	1,14782	0,62234	4,217	8	0,80
	0,102	0,06	0,179	1,15884	0,52812	4,499	8	0,86
<b>Grupo 2.1</b>	0,148	0,089	0,177	1,66344	0,83796	3,345	8	0,64
	0,147	0,089	0,175	1,64662	0,8545	3,220	8	0,61
	<b>0,152</b>	0,094	0,179	1,68432	0,9564	3,014	8	0,57
	0,18	0,107	0,235	2,03464	0,97324	4,925	8	0,94
<b>Grupo 2.2</b>	<b>0,146</b>	0,089	0,177	1,6298	0,87104	3,236	8	0,62
	0,149	0,09	0,178	1,67098	0,85834	3,312	8	0,63
	0,173	0,101	0,229	1,97258	0,8675	5,073	8	0,97
	0,148	0,089	0,176	1,66344	0,83796	3,310	8	0,63
<b>Grupo 2.3</b>	<b>0,192</b>	0,111	0,224	2,19936	0,92244	4,694	8	0,89
	0,193	0,111	0,223	2,21618	0,9059	4,714	8	0,90
	0,193	0,111	0,219	2,21618	0,9059	4,571	8	0,87
	0,181	0,108	0,235	2,04218	0,99362	4,855	8	0,92
<b>Grupo 3.1</b>	0,1535	0,0925	0,2545	1,72347	0,87621	5,968	8	1,14
	0,153	0,093	0,252	1,71042	0,90294	5,789	8	1,10
	0,155	0,096	0,257	1,71622	0,98062	5,704	8	1,09
	0,154	0,092	0,257	1,74	0,85	6,146	8	1,17
<b>Grupo 3.2</b>	0,153	0,093	0,252	1,71	0,90	5,789	8	1,10
	0,141	0,084	0,233	1,5921	0,76914	5,574	8	1,06
	0,139	0,084	0,235	1,55846	0,80222	5,536	8	1,05
	0,141	0,084	0,233	1,5921	0,76914	5,574	8	1,06

	0,1 52	0,09	0,25 5	1,72	0,81	6,214	8	1,18
<b>Grupo 3.3</b>	0,1 55	0,092	0,25 8	1,753 34	0,832 94	6,236	8	1,19
	0,1 56	0,092	0,25 7	1,77	0,82	6,256	8	1,19
	0,1 55	0,092	0,25 8	1,75	0,832 94	6,236	8	1,19
	0,1 24	0,082	0,13	1,324 72	0,976 48	1,229	8	0,23
<b>Vegeta tivo</b>	0,1 27	0,081	0,12 7	1,384 46	0,889 94	1,411	8	0,27
	0,1 255	0,081 5	0,12 85	1,354 59	0,933 21	1,320	8	0,25
	0,1 26	0,08	0,12 4	1,376 92	0,869 56	1,374	8	0,26
<b>Vegeta tivo2</b>	0,1 28	0,082	0,12 5	1,39	0,910 32	1,270	8	0,24
	0,1 26	0,082	0,12 9	1,358 36	0,943 4	1,303	8	0,25
	0,1 27	0,083	0,12 7	1,365 9	0,963 78	1,162	8	0,22
<b>Vegeta tivo 3</b>	0,1 25	0,08	0,12 7	1,360 1	0,886 1	1,425	8	0,27
	0,1 34	0,088	0,13 3	1,437 24	1,032 6	1,294	8	0,25

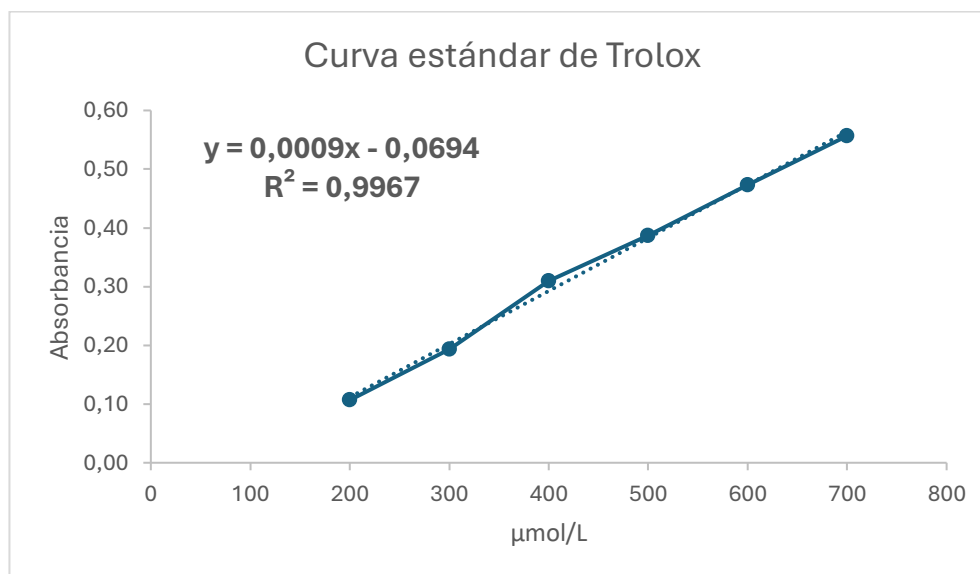
### Anexo 12.

*Datos de lectura de cada punto de la Curva estandar de Trolox.*

x	y
( $\mu\text{mol/l}$ )	Abs
200	0,11
300	0,19
400	0,31
500	0,39
600	0,47
700	0,56
<b>PENDIENTE</b>	0,000904762
<b>INTERSECCIÓN</b>	-0,069365079

### Anexo 13.

*Curva estandar de Trolox.*



**Anexo 14.**

*Capacidad antioxidante de cada muestra.*

<b>Muestra</b>	<b>Abs</b>	<b>Abs neta</b>	<b>Conc. (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b><math>\mu\text{mol Eq}</math> <b>Trolox/g</b> <b>muestra</b></b>
<b>Control R1</b>	0,36	0,38	492,98	164,33
	0,36	0,38	492,98	164,33
	0,37	0,37	481,93	160,64
<b>Control R2</b>	0,32	0,42	537,19	175,55
	0,32	0,42	537,19	175,55
	0,31	0,43	548,25	179,17
<b>Control R3</b>	0,36	0,38	492,98	160,06
	0,37	0,37	481,93	156,47
	0,36	0,38	492,98	160,06
<b>Grupo 1 R3</b>	0,32	0,42	537,19	171,08
	0,32	0,42	537,19	171,08
	0,31	0,43	548,25	174,60
<b>Grupo 1 R2</b>	0,34	0,40	515,09	171,70
	0,35	0,39	504,04	168,01
	0,35	0,39	504,04	168,01
<b>Grupo 1 R1</b>	0,34	0,40	515,09	166,16
	0,35	0,39	504,04	162,59
	0,33	0,41	526,14	169,72
<b>Grupo 2 R1</b>	0,34	0,40	515,09	166,16
	0,32	0,42	537,19	173,29
	0,32	0,42	537,19	173,29
<b>Grupo 2 R2</b>	0,35	0,39	504,04	166,90
	0,35	0,39	504,04	166,90
	0,35	0,39	504,04	166,90
<b>Grupo 2 R3</b>	0,34	0,40	515,09	167,24
	0,35	0,39	504,04	163,65
	0,33	0,41	526,14	170,82
<b>Grupo 3 R1</b>	0,30	0,44	559,30	185,20
	0,31	0,43	548,25	181,54
	0,32	0,42	537,19	177,88
<b>Grupo 3 R2</b>	0,32	0,42	537,19	175,55
	0,32	0,42	537,19	175,55
	0,31	0,43	548,25	179,17
<b>Grupo 3 R3</b>	0,32	0,42	537,19	171,08
	0,32	0,42	537,19	171,08

	0,32	0,42	537,19	171,08
Vegetativa R1	0,39	0,35	459,82	150,27
	0,37	0,37	481,93	157,49
	0,41	0,33	437,72	143,05
Vegetativa R2	0,39	0,35	459,82	149,29
	0,39	0,35	459,82	149,29
	0,39	0,35	459,82	149,29
Vitamina c	0,54	0,20	294,04	93735,39
	0,55	0,19	282,98	90211,92
	0,54	0,20	294,04	93735,39

## Anexo 15.

*Informe de la capacidad antioxidante de Dunaliella sp. realizado en la UEB.*

 <b>DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b>	<b>LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN</b> <small>Lagacorro 6, Km 1 1/2, vía a San Simón, Cantón Guasmán, Provincia Bolívar, Ecuador</small>		Código	IR-AA
			Versión	1
			Año	2025
			Página	Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYOS N° 270

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA					
Solicitante:	Manuel Alejandro Patiño Rodríguez				
Muestra:	Microalga Dunaliella				
Código asignado UEB:	INV 942, INV 943, INV 944, INV 945, INV 946, INV 947, INV 948, INV 949, INV 950, INV 951, INV 952, INV 953, INV 954, INV 955, INV 956				
Estado de la muestra:	Sólido				
Envase de recepción:	Bolsa de papel con 900 mg aprox. de contenido de muestra				
Análisis requerido(s):	Actividad antioxidante				
Fecha de recepción:	15 de septiembre de 2025				
Fecha de análisis:	15 al 18 de septiembre 2025				
Fecha de informe:	26 de septiembre de 2025				
Técnico (s) asignado:	MFQM				
RESULTADOS OBTENIDOS					
Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado
INV 942	Microalga Dunaliella Control R1	Actividad antioxidante	DPPH ((2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	µmol ET/g muestra	163,10
INV 943	Microalga Dunaliella Control R2				176,76
INV 944	Microalga Dunaliella Control R3				158,86
INV 945	Microalga Dunaliella Grupo 1 R3				172,25
INV 946	Microalga Dunaliella Grupo 1 R2				169,24
INV 947	Microalga Dunaliella Grupo 1 R1				166,16
INV 948	Microalga Dunaliella Grupo 2 R1				170,91
INV 949	Microalga Dunaliella Grupo 2 R2				166,90
INV 950	Microalga Dunaliella Grupo 2 R3				167,24
INV 951	Microalga Dunaliella Grupo 3 R1				181,54
INV 952	Microalga Dunaliella Grupo 3 R2				176,76
INV 953	Microalga Dunaliella Grupo 3 R3				171,08
INV 954	Microalga Dunaliella Vegetativa 1				150,27
INV 955	Microalga Dunaliella Vegetativa 2				149,29

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

Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado
INV 956	Vitamina C	Actividad antioxidante	DPPH ((2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)	µmol ET/g muestra	92560,90

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

Ing. María Fernanda Quinteros  
**TÉCNICA DE LABORATORIO DIVIUEB**  
**ELABORADO**

Ing. Favian Bayas PhD.  
**DIRECTOR DIVIUEB**  
**REVISADO**

## Anexo 16.

*Prueba Kruskal-Wallis para clorofila  $\alpha$ .*

<b>Kruskal-Wallis test for equal medians</b>	
<b>H (chi2):</b>	36,43
<b>Hc (tie corrected):</b>	36,44
<b>p (same):</b>	2,352E-07

## Anexo 17.

*Prueba Kruskal-Wallis para Clorofila  $\beta$ .*

<b>Kruskal-Wallis test for equal medians</b>	
<b>H (chi2):</b>	31,1
<b>Hc (tie corrected):</b>	31,11
<b>p (same):</b>	2,911E-06

### Anexo 18.

*Prueba Kruskal-Wallis de carotenoides totales.*

<b>Kruskal-Wallis test for equal medians</b>	
<b>H (chi2):</b>	48,26
<b>Hc (tie corrected):</b>	48,27
<b>p (same):</b>	8,28E-10

### Anexo 19.

*Prueba Post-Hoc Dunn's de carotenoides totales.*

	<b>Control</b>	<b>G1</b>	<b>G2</b>	<b>G3</b>	<b>Vegetativo</b>
<b>Control</b>		0,088	0,8289	5,931E-06	1
<b>G1</b>	0,088		1	0,1761	0,0003236
<b>G2</b>	0,8289	1		0,01117	0,008489
<b>G3</b>	5,931E-06	0,1761	0,01117		1,24E-7
<b>Vegetativo</b>	0,8349	0,0003236	0,008489	1,24E-7	

### Anexo 20.

*Anova de una via para capacidad antioxidante.*

```
> ### 4) ANOVA
> anova_act <- aov(actividad ~ tratamiento, data = datos_act_long)
> summary(anova_act)
              Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
tratamiento  4    2649    662.3    23.46 1.02e-09 ***
Residuals   37    1045     28.2
---
signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
3 observations deleted due to missingness
```

## Anexo 21.

*Prueba POST-HOC Tukey HSD.*

```
> ### 5) POST-HOC TUKEY
> TukeyHSD(anova_act)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = actividad ~ tratamiento, data = datos_act_long)

$tratamiento
              diff          lwr          upr          p adj
Grupo 1-Control  2.9766667 -4.20416673  10.157500  0.7578568
Grupo 2-Control  2.1100000 -5.07083340   9.290833  0.9155129
Grupo 3-Control 10.2188889  3.03805549  17.399722  0.0020300
Vegetativo-Control -16.4600000 -24.48841580  -8.431584  0.0000088
Grupo 2-Grupo 1  -0.8666667 -8.04750006   6.314167  0.9967815
Grupo 3-Grupo 1   7.2422222  0.06138883  14.423056  0.0472082
Vegetativo-Grupo 1 -19.4366667 -27.46508247 -11.408251  0.0000003
Grupo 3-Grupo 2   8.1088889  0.92805549  15.289722  0.0201993
Vegetativo-Grupo 2 -18.5700000 -26.59841580 -10.541584  0.0000009
Vegetativo-Grupo 3 -26.6788889 -34.70730469 -18.650473  0.0000000
```