



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente

Carrera de Agroindustrias

Tema:

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BETACAROTENOS, CLOROFILA
A Y B MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (HPLC) DE LA
MICROALGA DUNALIELLA (*Dunaliella salina*) Y DE LA
CIANOBACTERIA LEPTO (*Leptolyngbya lagerheimii*)

Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero/a Agroindustrial otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente, Carrera de Agroindustrias.

Autora:

María Adalixe Urbano Gavilánez

Tutor:

Ing. Franz Patricio Verdezoto Mendoza Mg.

Guaranda – Ecuador


2025

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BETACAROTENOS, CLOROFILA
A Y B MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA (HPLC) DE LA
MICROALGA DUNALIELLA (*Dunaliella salina*) Y DE LA
CIANOBACTERIA LEPTO (*Leptolyngbya lagerheimii*)


REVISADO Y APROBADO POR:



Ing. Franz Patricio Verdezoto Mendoza Mg.
TUTOR



Ing. Darwin Alberto Núñez Torres Mg.
PAR LECTOR




Ing. Isidro Favián Bayas Morejón PhD.
PAR LECTOR

CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

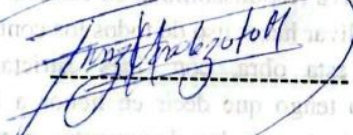
Yo, Urbano Gavilánez María Adalixe, con CI 0202522850, declaro que el trabajo y los resultados presentados en este informe, no han sido previamente presentados para ningún grado o calificación profesional; y, que las referencias bibliográficas que se incluyen han sido consultadas y citadas con su respectivo autor(es).

La Universidad Estatal de Bolívar, puede hacer uso de los derechos de publicación correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, su Reglamentación y la Normativa Institucional vigente.



María Adalixe Urbano Gavilánez

CI.: 0202522850



Ing. Franz Patricio Verdezoto Mendoza Mg.

CI.: 0201668043

Se otorgó ante mi y en fe de ello
confiero ésta *Pr. meca*..... copia
certificada, firmada y sellada en 2^{as}
Guaranda...!2...de Septiembre del 20.25


Dr. Hernán Criollo Arco
NOTARIO SEGUNDO DEL CANTÓN GUARANDA



20250201002P01176

DECLARACION JURAMENTADA
OTORGA: MARÍA ADALIXE URBANO GAVILÁNEZ
CUANTIA: INDETERMINADA
DI 2 COPIAS




En la ciudad de Guaranda, provincia Bolívar, República del Ecuador, hoy día viernes doce de septiembre de dos mil veinticinco, ante mí DOCTOR HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS, NOTARIO SEGUNDO DE ESTE CANTÓN, comparece la señorita María Adalixe Urbano Gavilánez, por sus propios derechos, de estado civil soltera, domiciliada en Vinchoa Central, parroquia Veintimilla, cantón Guaranda, provincia Bolívar, con celular número: cero nueve seis ocho cero cinco uno seis tres tres, correo electrónico: mariaurbanogavilanez@gmail.com. La compareciente es de nacionalidad ecuatoriana, mayor de edad a quien de conocerla doy fe en virtud de haberme exhibido su cédula de ciudadanía en base a la que procedo a obtener su certificado electrónico de datos de identidad ciudadana, del Registro Civil, mismo que agrego a esta escritura como documento habilitante; bien instruida por mí el Notario en el objeto y resultados de esta escritura de Declaración Juramentada que a celebrarla proceden, libre y voluntariamente.- En efecto juramentado que fueron en legal forma previa las advertencias de la gravedad del juramento, de las penas de perjurio y de la obligación que tiene de decir la verdad con claridad y exactitud, declaran lo siguiente: "Que previo a la obtención del Título de Ingeniera Agroindustrial, otorgado por la Universidad Estatal de Bolívar, a través de la Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente, de la carrera de Agroindustrias, manifestó que los criterios e ideas emitidas en el presente Proyecto de investigación Titulado: "EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BETACAROTENOS, CLOROFILA A Y B MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA (HPLC) DE LA MICROALGA DUNALIELLA (*Dunaliella salina*) Y DE LA CIANOBACTERIA LEPTO (*Leptolyngbya lagerheimii*)", es de mi exclusiva responsabilidad en calidad de autora, además autorizo a la Universidad Estatal de Bolívar hacer uso de todos los contenidos que me pertenece o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación. Es todo cuanto tengo que decir en honor a la verdad". Hasta aquí la declaración juramentada que junto con los documentos anexos y habilitantes que se incorpora queda elevada a escritura pública con todo el valor legal, y que la compareciente acepta en todas y cada una de sus partes, para la celebración de la presente escritura se observaron los preceptos y requisitos previstos en la Ley Notarial; y, leída que le fue a la compareciente por mí el Notario, se ratifica y firma conmigo en unidad de acto quedando incorporada en el Protocolo de esta Notaría, de todo cuanto DOY FE.

María Adalixe Urbano Gavilánez
C.C. 0202522850

DR. HERNÁN RAMIRO CRIOLLO ARCOS
NOTARIO SEGUNDO DE CANTÓN GUARANDA

María Urbano

Tesis_Urbano_María.pdf

 My Files

 My Files

 Universidad Estatal de Bolívar

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:496094910

112 páginas

Fecha de entrega

10 sep 2025, 5:59 p.m. GMT-5

20.866 palabras

Fecha de descarga

11 sep 2025, 6:32 p.m. GMT-5


121.708 caracteres

Nombre del archivo

Tesis_Urbano_María.pdf

Tamaño del archivo

2.0 MB



Ing. Franz Patricio Verdezoto Mendoza Mg.

TUTOR

6% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...




Filtrado desde el informe

- Trabajos entregados

Exclusiones


- N.º de coincidencias excluidas

Fuentes principales

- 6%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**
119 caracteres sospechosos en N.º de página
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



Ing. Franz Patricio Verdezoto Mendoza Mg.
TUTOR

DEDICATORIA

A Dios, a mis padres Fredy y Adaly, mis hermanas Daniela y Esthefany, mi abuelo Manuel, mis tías María y Teresa, mi prima Gabriela, a mi compañero de vida Darwin. Por apoyarme siempre incondicionalmente en todo momento, ser un faro en los momentos más complejos.

A mí, por todo mi esfuerzo, dedicación y haberlo logrado.

Con todo mi amor, María

AGRADECIMIENTO

A Dios, mis padres Fredy y Adaly, mis hermanas Daniela y Esthefany, mi abuelo Manuel, mis tías Teresa y María, mis primos en especial a Gaby, mi novio Darwin. Por ser un pilar fundamental en todo mi proceso académico, por apoyarme y darme fuerzas siempre. Les amo con todo mi corazón, me faltará vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí.

A la Universidad Estatal de Bolívar, en especial a mis docentes Carlos Moreno, Patricia Iza, Darwin Núñez, Franz Verdezoto, José Luis Altuna, Juan Gaibor, Marcelo García, Carlos Jácome.

Al Laboratorio de Investigación de la Universidad Estatal de Bolívar, a los técnicos de laboratorio en especial a la Ing. María Fernanda Quinteros, Blga. Isabel Paredes, Ing. Erika Cortéz por su acompañamiento y apoyo técnico en mi proceso investigativo.

Al Proyecto de Investigación Cedia “Dietas funcionales basadas en carotenoides derivados de dos especies de microalgas para mejorar la productividad y salud de peces (*Oncorhynchus mykiss*) en etapas iniciales”. A su director Ing. Franz Verdezoto por permitirme trabajar dentro del proyecto, a Ing. María Fernanda Quinteros por su apoyo técnico en toda la fase experimental.

ÍNDICE

DEDICATORIA	VII
AGRADECIMIENTO	VIII
INDICE DE TABLAS	XIII
INDICE DE FIGURAS	XIV
INDICE DE ANEXOS	XV
RESUMEN	XVI
SUMMARY	XVII
CAPÍTULO I	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. PROBLEMA	3
1.3. OBJETIVOS	4
1.3.1. General	4
1.3.2. Específicos	4
1.4. HIPÓTESIS	5
1.4.1. Hipótesis nula	5
1.4.2. Hipótesis alterna	5
CAPÍTULO II	6
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Microalgas	6
2.1.1. Dunaliella salina	6
2.2. Cianobacterias	10
2.2.1. Leptolyngbya lagerheimii	11
2.3. Pigmentos fotosintéticos	14
2.3.1. Betacarotenos	15

2.3.2.	Clorofilas a y b	16
2.4.	Análisis de materias primas	19
2.4.1.	Capacidad antioxidante	19
2.4.2.	Contenido de proteína	20
2.5.	Técnicas de extracción	20
2.5.1.	Extracción con solventes orgánicos	20
2.5.2.	Extracción por Ultrasonido	20
2.5.3.	Factores que afectan la eficiencia de extracción.	21
2.6.	Cromatografía Líquida de Alta Precisión HPLC (High – Performance Liquid Chromatography)	23
2.6.1.	Partes de un cromatógrafo	24
2.6.2.	Fases móviles y estacionarias en Cromatografía Líquida de Alta Resolución	25
2.6.3.	Detector DAD	26
2.6.4.	Parámetros cromatográficos claves	27
2.6.5.	Cuantificación	28
2.6.6.	Cromatogramas	30
2.7.	Diseño de productos agroindustriales	31
CAPÍTULO III		33
3.	MARCO METODOLÓGICO	33
3.1.	Ubicación de la investigación	33
3.1.1.	Localización de la investigación	33
3.1.2.	Situación geográfica y climática de la localidad	33
3.1.3.	Zona de vida	34
3.2.	Metodología	34
3.2.1.	Material en estudio	34

3.2.2.	Factores en estudio	36
3.2.3.	Tratamientos	36
3.2.4.	Características del experimento	37
3.2.5.	Tipo de diseño experimental o estadístico	37
3.2.6.	Manejo de la investigación	38
3.2.7.	Métodos de evaluación	40
3.2.8.	Análisis de datos	42
CAPITULO IV		43
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1.	INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	43
4.1.1.	Contenido de antioxidantes	43
4.1.2.	Contenido de proteína	44
4.1.3.	Condiciones de HPLC	45
4.1.4.	Cuantificación del contenido de betacarotenos presente en las muestras de dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>) y leptó (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i>) mediante HPLC	45
4.1.5.	Cuantificación del contenido de clorofila a presente en las muestras de dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>) y leptó (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i>) mediante HPLC	49
4.1.6.	Cuantificación del contenido de clorofila b presente en las muestras de dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>) y leptó (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i>) mediante HPLC	53
4.1.7.	Diseño del producto agroindustrial	57
4.2.	COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS	63
CAPÍTULO V		64
5.1.	CONCLUSIONES	64

5.2. RECOMENDACIONES	66
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación taxonómica de <i>Dunaliella salina</i>	6
Tabla 2 Clasificación Taxonómica.....	12
Tabla 3 Localización de la investigación	33
Tabla 4 Parámetros climáticos del territorio	33
Tabla 5 Factores de estudio.....	36
Tabla 6 Combinación de tratamientos de los factores	36
Tabla 7 Características del experimento	37
Tabla 8 Resultados del contenido de antioxidantes mediante DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).....	43
Tabla 9 Resultados de contenido de proteína mediante el método DUMAS.....	44
Tabla 10 Método para el análisis de betacaroteno, clorofila a y b.....	45
Tabla 11 Contenido de betacarotenos	46
Tabla 12 ANOVA del contenido de betacarotenos.....	46
Tabla 14 Contenido de clorofila a.....	50
Tabla 15 ANOVA del contenido de clorofila a	51
Tabla 17 Contenido de clorofila b.....	54
Tabla 18 ANVOVA para el contenido de clorofila b	55
Tabla 20 Formulación del suplemento en polvo de betacarotenos.	59
Tabla 21 Tabla nutricional del suplemento de betacarotenos	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Dunaliella salina	7
Figura 2 Cianobacterias.....	11
Figura 3 Curva de estándar de calibración de betacarotenos	45
Figura 4 Diagrama de Pareto del contenido de betacaroteno de la microalga dunaliella (Dunaliella salina) y de la cianobacteria leptó (Leptolyngbya lagerheimii)	48
Figura 5 Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de betacarotenos.....	49
Figura 6 Curva de estándar de calibración de clorofila a.....	50
Figura 7 Diagrama del Pareto del contenido de clorofila a.....	52
Figura 8 Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de clorofila a	53
Figura 9 Curva de estándar de calibración de clorofila b.....	54
Figura 10 Diagrama de Pareto.....	56
Figura 11 Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de clorofila b	57
Figura 12 Diagrama de flujo del suplemento en polvo de betacarotenos	60
Figura 13 Empaque del envase	62
Figura 14 Diseño del sobre monodosis	63

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Mapa de ubicación de la investigación.....	82
Anexo 2 Resultados de los análisis	83
Anexo 3 Fotografías de muestras	89
Anexo 4 Lavado de muestras	90
Anexo 5 HPLC	91
Anexo 6 Software HPLC	92
Anexo 7 Cromatogramas dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>)	93
Anexo 8 Cromatogramas leptos (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i>)	94
Anexo 9 Análisis de capacidad antioxidante	95
Anexo 10 Diseño del suplemento en polvo de betacaroteno	96
Anexo 11 Glosario de términos técnicos	97

RESUMEN

Este estudio tuvo como objetivo de extraer y cuantificar el contenido de betacarotenos, clorofila a y b en la microalga *Dunaliella salina* y la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*), empleando dos métodos de separación y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La investigación surgió ante la falta de protocolos estandarizados en la Universidad Estatal de Bolívar para la extracción y análisis de estos pigmentos en dichos organismos, lo cual limita su aprovechamiento sostenible en aplicaciones biotecnológicas. El trabajo se enmarcó en el proyecto CEDIA 'Dietas funcionales basadas en carotenoides derivados de microalgas para mejorar la productividad y salud de truchas (*Oncorhynchus mykiss*) en etapas iniciales', utilizando muestras proporcionadas por la Universidad Península de Santa Elena. Adicionalmente, se evaluó la capacidad antioxidante mediante DPPH y el contenido proteico mediante DUMAS de ambas especies. Los datos fueron analizados mediante ANOVA multifactorial y comparación de medias al 95% de confianza respecto a la media. Los resultados mostraron que la microalga *Dunaliella salina* presentó un mayor contenido proteico (11.25%) en comparación con la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*) (9.16%), de la microalga *Dunaliella salina* se obtuvo 130,41 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, mientras que de la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*) no se pudo determinar la capacidad antioxidante. El método de extracción LAP que combina solventes polares y disruptores físicos demostró ser el más eficaz, al lograr una mayor ruptura de las paredes celulares. Respecto a los pigmentos, la microalga *Dunaliella salina* exhibió mayores concentraciones de betacarotenos y clorofila b, mientras que la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*) destacó en clorofila a, hay que considerar que las cianobacterias no contienen clorofila b. Con base en estos hallazgos, se desarrolló un suplemento en polvo de betacarotenos en formato monodosis a partir de la microalga *Dunaliella salina*.

SUMMARY

The objective of this study was to extract and quantify the content of beta-carotene, chlorophyll a, and chlorophyll b in the microalgae *Dunaliella salina* and the cyanobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, using two separation methods and high-performance liquid chromatography (HPLC). The research arose due to the lack of standardized protocols at Bolívar State University for the extraction and analysis of these pigments in these organisms, which limits their sustainable use in biotechnological applications. The work was part of the CEDIA project 'Functional diets based on carotenoids derived from microalgae to improve the productivity and health of trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the early stages', using samples provided by the University of Santa Elena Peninsula. In addition, the antioxidant capacity was evaluated using DPPH and the protein content using DUMAS for both species. The data were analyzed using multifactorial ANOVA and comparison of means at 95% confidence with respect to the mean. The results showed that the microalgae *Dunaliella salina* had a higher protein content (11.25%) compared to the cyanobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* (9.16%). *Dunaliella salina* had 130.41 $\mu\text{mol ET/g}$ sample, while the antioxidant capacity of the cyanobacterium *Leptolyngbya lagerheimii* could not be determined. The LAP extraction method, which combines polar solvents and physical disruptors, proved to be the most effective, achieving greater cell wall disruption. With regard to pigments, the microalgae *Dunaliella salina* exhibited higher concentrations of beta-carotene and chlorophyll b, while the cyanobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* stood out in chlorophyll a. It should be noted that cyanobacteria do not contain chlorophyll b. Based on these findings, a single-dose beta-carotene powder supplement was developed from the microalgae *Dunaliella salina*.

CAPÍTULO I

1.1.INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el interés por los compuestos bioactivos de origen natural ha crecido significativamente debido a sus aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Entre estos compuestos, los carotenoides y las clorofilas destacan por sus propiedades antioxidantes, su potencial como colorantes naturales y sus beneficios para la salud humana. Las microalgas y cianobacterias se han consolidado como fuentes prometedoras de estos metabolitos, por su rápido crecimiento, su capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales y su riqueza en pigmentos fotosintéticos (Youssef & et al , 2022).

En el contexto actual de la biotecnología y la sostenibilidad, el estudio de microorganismos fotosintéticos como las microalgas y las cianobacterias ha cobrado una relevancia creciente debido a su potencial como fuente natural de compuestos bioactivos. Entre los compuestos destacan los pigmentos como los betacarotenos y las clorofilas a y b, conocidos por sus propiedades antioxidantes. La búsqueda de fuentes alternativas y sostenibles de estos compuestos ha conducido a un renovado interés por especies como *dunaliella* (*Dunaliella salina*), una microalga halotolerante, y *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) una cianobacteria con un perfil pigmentario interesante (Zhang & et al, 2020).

La microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) es ampliamente reconocida por su alta capacidad de acumulación de betacarotenos, especialmente bajo condiciones de estrés ambiental, posicionándola como una de las principales fuentes naturales de este carotenoide. Por su parte, *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*), aunque menos estudiada, ha demostrado un notable contenido de pigmentos fotosintéticos, lo cual sugiere su potencial biotecnológico aún no explorado a fondo. Estudios recientes han destacado que estas especies no solo son eficientes en la síntesis de pigmentos, sino que también representan una alternativa sostenible frente al uso de colorantes sintéticos, cuya demanda y regulación han incrementado en los últimos años, por lo que, la caracterización y cuantificación de estos compuestos es fundamental para evaluar su potencial biotecnológico y económico (Quiroz & Gutierrez, 2024).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las metodologías más precisas para la separación, identificación y cuantificación de pigmentos en organismos fotosintéticos. Su alta sensibilidad y especificidad permiten un análisis detallado del perfil cromatográfico, lo cual es crucial para evaluar el rendimiento biotecnológico de cepas cultivadas bajo condiciones controladas (Yalcin & et al , 2020).

En este contexto, la presente tesis tiene como objetivo la extracción y cuantificación de β -carotenos, clorofila a y clorofila b mediante HPLC, a partir de biomasa de *Dunaliella salina* y *Leptolyngbya lagerheimii*, con el fin de evaluar su contenido de pigmentos y explorar su potencial como materia prima en aplicaciones industriales sostenibles.

1.2.PROBLEMA

A nivel global, la demanda de compuestos bioactivos de origen natural, como los betacarotenos y las clorofilas, ha crecido significativamente debido a sus aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Estos pigmentos, presentes en microalgas y cianobacterias, son valorados por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas y su rol en la nutrición humana. Sin embargo, la extracción y cuantificación de estos compuestos enfrenta desafíos técnicos, como la variabilidad en los métodos analíticos y la falta de estandarización en procesos de alta precisión, como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

En América Latina, el aprovechamiento de microalgas y cianobacterias para la obtención de compuestos bioactivos es reciente, a pesar de la rica biodiversidad de ecosistemas acuáticos en la región. La falta de infraestructura tecnológica avanzada y de investigaciones aplicadas restringe el desarrollo de análisis de especies nativas, como *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*). Además, los altos costos asociados a técnicas como HPLC y la escasa formación especializada en biotecnología marina limitan la capacidad de los países latinoamericanos para integrarse a los mercados globales de compuestos bioactivos, perpetuando su dependencia de tecnologías importadas.

En Ecuador, la ausencia de protocolos optimizados para la extracción y cuantificación de betacarotenos, clorofila a y b mediante HPLC restringe el aprovechamiento de estas especies nativas. Asimismo, la falta de investigaciones locales que caractericen la composición bioquímica de estas microalgas y cianobacterias limita su aplicación en sectores industriales y agrícolas del país.

La falta de métodos estandarizados y optimizados para la extracción y cuantificación de betacarotenos, clorofila a y b mediante HPLC en la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) en los laboratorios de la Universidad Estatal de Bolívar, representa una barrera para su aprovechamiento sostenible.

1.3.OBJETIVOS

1.3.1. General

- Determinar el contenido de betacarotenos, clorofila a y b de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y de la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*).

1.3.2. Específicos

- Analizar el contenido de antioxidantes y de proteína de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*).
- Comparar los resultados cromatográficos, para determinar el tratamiento con mayor contenido de betacarotenos, clorofila a y b.
- Diseñar un producto agroindustrial con el mejor tratamiento.

1.4.HIPÓTESIS

1.4.1. Hipótesis nula

H₀: La microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii.*) contienen igual cantidad de betacarotenos, clorofila a y b.

1.4.2. Hipótesis alterna

H_a: La microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii.*) no contienen igual cantidad de betacarotenos, clorofila a y b.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Microalgas

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que habitan en ambientes acuáticos, tanto dulces como salinos. Son organismos unicelulares o coloniales capaces de captar la energía solar para producir biomasa y compuestos bioactivos, lo que las convierte en una importante fuente de productos de interés industrial y biotecnológico (Kusmayadi & et al , 2021).

2.1.1. *Dunaliella salina*

Es una microalga unicelular verde, que se encuentra comúnmente en ambientes hipersalinos como lagunas saladas y salinas de evaporación. Esta microalga es conocida por su capacidad para sobrevivir en condiciones extremadamente salinas gracias a su alta concentración de β -caroteno y glicerol, que le permiten protegerse del estrés osmótico y la radiación UV (Barbosa & et al , 2023).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Dunaliella salina

Taxonomía de <i>Dunaliella salina</i>	
Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Familia	Chlorophyta
Clase	Chlorophytina
Orden	Chlamydomonadales
Familia	Dunaliellaceae
Género	Dunaliella
Especie	Dunaliella salina

Tomado de: (Assunção & et al , 2012)

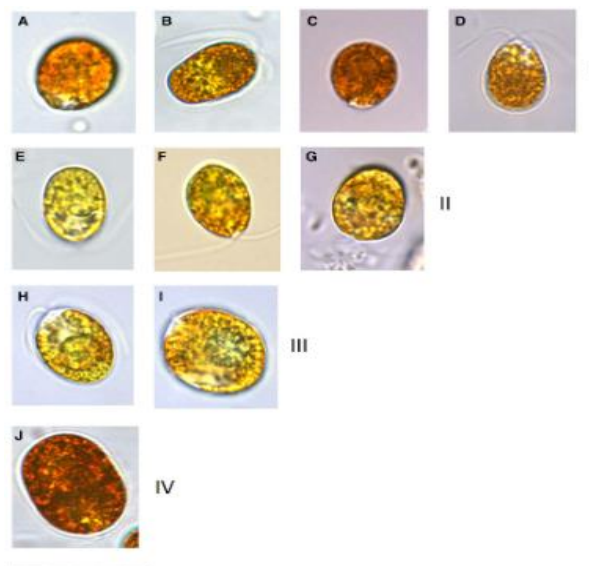
Presenta una morfología simple y adaptable, caracterizada por células de forma ovoide o elipsoidal, con dimensiones que oscilan entre 8 y 16 μm de longitud y 6 a 10 μm de ancho. Cada célula posee dos flagelos isocontados, localizados en el extremo anterior, los cuales le brindan movilidad en medios acuáticos (Jo & et al , 2024).

A diferencia de otras microalgas verdes, *Dunaliella salina* carece de pared celular rígida. En su lugar, presenta una envoltura celular flexible compuesta por una capa mucilaginosa, lo que le permite tolerar altas presiones osmóticas y cambios bruscos de salinidad. Su cloroplasto es único, de gran tamaño y con forma de copa, y contiene uno o más pirenoides, estructuras asociadas a la concentración de carbono y síntesis de almidón (Borovkov & et al, 2019).

La coloración de la microalga puede variar desde verde hasta un tono rojizo o anaranjado, dependiendo de las condiciones ambientales. En particular, bajo condiciones de estrés como alta intensidad lumínica, deficiencia de nutrientes o elevada salinidad, la célula incrementa la síntesis y acumulación intracelular de betacarotenos, pigmentos de tipo carotenoides que se almacenan en cuerpos lipídicos (Kim & et al , 2023).

Figura 1

Dunaliella salina



Los números entre paréntesis tras el nombre de la cepa indican el subgrupo de *D. salina*. (a) *D. salina* DF40 (I), (b) *D. salina* DF45 (I), (c) *D. salina* CCAP 19/18 (I), (d) *D. salina* MUR22 (I), (e) *D. salina* DF17 (II), (f) *D. salina* CCAP 19/25 (II), (g) *D. salina* UTEX 1644 (II), (h) *D. salina* T41 (III), (i) *D. salina* T37 (III), (j) *D. salina* DF15 (IV). La barra de escala equivale a 25 μm . Tomado de: (Highfield & et al , 2021).

2.1.1.1. Fisiología de la microalga *Dunaliella salina*

Su metabolismo principal es fotoautótrofo, realizando fotosíntesis oxigénica mediante pigmentos como la clorofila a, clorofila b y diversos carotenoides. La presencia y proporción de estos pigmentos está directamente relacionada con la eficiencia fotosintética y la adaptación a condiciones ambientales variables, ya que la *Dunaliella salina*, se adapta a condiciones de estrés ambiental sobreproduciendo betacarotenos, los cuales actúan como antioxidantes, protegiendo a la célula contra especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la fotoinhibición o condiciones adversas (Pourkarimi & et al, 2020).

Una de las características fisiológicas más destacadas de *Dunaliella salina* es su capacidad para sobrevivir en concentraciones salinas extremas, desde 0,2 M hasta más de 5,5 M de NaCl. Para mantener su equilibrio osmótico, la microalga sintetiza grandes cantidades de glicerol intracelular, un osmolito compatible que evita la deshidratación celular sin afectar negativamente el metabolismo enzimático (Ben-Amotz, 2019).

2.1.1.2. Capacidad de acumulación de betacarotenos en la microalga *Dunaliella salina* bajo diferentes condiciones de estrés.

La acumulación de betacarotenos en *Dunaliella salina* es un mecanismo adaptativo que le permite protegerse frente a situaciones adversas, como irradiación excesiva, altas concentraciones de sal, limitación de nutrientes y estrés oxidativo. Bajo condiciones óptimas de cultivo, la microalga presenta un contenido relativamente bajo de carotenoides (0,1 a 0,5% del peso seco), predominando los pigmentos clorofílicos. Sin embargo, cuando es sometida a factores de estrés, puede llegar a acumular hasta un 10-14% de betacaroteno en su biomasa total (Ben-Amotz & Avron, 1983).

Entre los principales factores que inducen la sobreproducción de betacarotenos se encuentran:

- **Alta intensidad lumínica:** La exposición a luz intensa induce una respuesta fotoprotectora que estimula la síntesis de betacarotenos, los cuales absorben el exceso de radiación y disipan la energía como calor (Yazdani, 2022).
- **Elevada salinidad:** El crecimiento en medios con concentraciones elevadas de NaCl (por encima de 2 M) promueve la acumulación de glicerol como osmolito intracelular, y al mismo tiempo activa vías metabólicas relacionadas con la biosíntesis de carotenoides, particularmente el betacaroteno. Esta doble respuesta metabólica es clave para la adaptación osmótica y fotoprotección de la célula (Ahmed & et al , 2017).
- **Limitación de nitrógeno y fósforo:** La restricción de nutrientes esenciales inhibe la división celular pero no detiene la captación de energía lumínica, lo que genera un desequilibrio metabólico que es compensado por la canalización del exceso de carbono hacia rutas secundarias como la síntesis de carotenoides. Esta estrategia permite mantener el balance redox celular (Bonfond & et al , 2017).
- **Temperaturas elevadas:** El estrés térmico también puede estimular la acumulación de betacarotenos, aunque su efecto suele ser sinérgico cuando se combina con alta irradiancia y salinidad (Borovkov & et al, 2021).

A nivel intracelular, los betacarotenos se depositan en grandes cantidades dentro de los cuerpos lipídicos situados entre la membrana plasmática y el cloroplasto. En condiciones extremas, estos pigmentos pueden representar la fracción mayoritaria del contenido celular, desplazando a la clorofila y modificando visiblemente la coloración de las células hacia tonos anaranjados o rojizos.

2.1.1.3. Aplicaciones biotecnológicas de la microalga *Dunaliella salina*.

Las aplicaciones de la microalga *Dunaliella salina* abarcan diversas industrias, incluyendo la alimentaria, farmacéutica, cosmética y ambiental.

- **Producción de carotenoides, clorofilas y otros pigmentos:** *Dunaliella salina* es una fuente natural eficiente de β -caroteno, clorofilas a y b

pigmentos con aplicaciones en las industrias alimentaria y cosmética (Pourkarimi & et al , 2020).

- **Biocombustibles:** La microalga es utilizada en la producción de biocombustibles debido a su alto contenido de lípidos, lo que la hace adecuada para la generación de bioenergía (Monte & et al , 2019).
- **Industria Farmacéutica y Nutracéutica:** Al contener proteínas, lípidos y ácidos grasos poliinsaturados, lo que la hace útil en la producción de suplementos dietéticos y productos farmacéuticos (Araj-Shirvani & et al , 2024).
- **Tratamiento de Aguas Residuales:** Su capacidad para crecer en ambientes salinos y tratar aguas residuales salinas la convierte en una opción sostenible para la gestión de efluentes, al tiempo que genera bioproductos de interés (De Souza & et al , 2024).
- **Producción de Proteínas Recombinantes:** Se investiga como plataforma para la expresión de proteínas recombinantes, con potencial para aplicaciones en vacunas y otros productos biotecnológicos (Castellanos-Huerta & et al , 2022).

2.2.Cianobacterias

Cianobacterias, también conocidas como algas verdeazuladas, son microorganismos fotosintéticos procarióticos que desempeñan un papel crucial en diversos ecosistemas. Su capacidad para producir una amplia gama de compuestos bioactivos las hace valiosas en múltiples campos, desde la agricultura hasta la biotecnología y la medicina (Núñez & Dos Santos , 2020).

Son procariontes del dominio Bacteria, caracterizados por su capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica, lo que contribuyó significativamente a la oxigenación temprana de la atmósfera terrestre. Además, muchas cianobacterias pueden fijar nitrógeno atmosférico gracias a estructuras especializadas llamadas heterocistos, lo que las hace fundamentales para la fertilidad del suelo y el equilibrio de nutrientes en ecosistemas acuáticos (Demay & et al , 2019).

Estos microorganismos tienen una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas, como la producción de biofertilizantes y bioremediación. Por ejemplo, se utilizan en el tratamiento de residuos debido a su capacidad para adsorber metales pesados y degradar contaminantes orgánicos. Sin embargo, algunas especies producen toxinas, como microcistinas y anatoxinas, que representan un riesgo para la salud humana y ambiental (Khalifa & et al , 2021).

Además, las cianobacterias tienen una gran diversidad morfológica y ecológica, adaptándose a diversos hábitats, desde ambientes marinos hasta suelos y aguas dulceacuícolas. Están influenciadas por factores como la luz, temperatura y disponibilidad de nutrientes, lo que define su distribución y diversidad (Thuan & et al , 2019).

Figura 2

Cianobacterias



2.2.1. *Leptolyngbya lagerheimii*

Leptolyngbya lagerheimii es una cianobacteria filamentososa no heterocistosa, se caracteriza por presentar tricomas delgados, rectos o ligeramente curvados, encerrados en una vaina mucilaginosa transparente o ligeramente coloreada. Es un organismo fotoautótrofo que realiza fotosíntesis oxigénica mediante un sistema similar al de las plantas superiores. Además, su capacidad de producir ficobiliproteínas le permite captar eficientemente diferentes longitudes de onda de luz, lo que favorece su adaptación a condiciones de iluminación baja o variable. (Li & et al , 2020).

Esta cianobacteria puede crecer en una amplia gama de condiciones ambientales, incluyendo ambientes extremófilos, como suelos áridos, rocas, aguas termales o zonas de alta salinidad. Algunas cepas han mostrado capacidad de sobrevivencia en medios con limitación de nutrientes, gracias a mecanismos de adaptación como la formación de biofilms, la secreción de polisacáridos extracelulares y la utilización eficiente del nitrógeno y el fósforo (Kettner & et al , 2022).

Tabla 2

Clasificación Taxonómica

Taxonomía de <i>Leptolyngbya lagerheimii</i>	
Reino	Bacteria
Subreino	Negibacteria
Familia	Cyanobacteria
Clase	Cianophyceae
Orden	Pseudanabaenales
Familia	Leptolyngbyaceae
Género	Leptolyngbya
Especie	<i>Leptolyngbya lagerheimii</i>

Tomado de: Guiry (2015).

2.2.1.1.Fisiología de *Leptolyngbya lagerheimii*.

Las células de *Leptolyngbya* son generalmente isodiamétricas o ligeramente más largas que anchas, con un diámetro que varía entre 1.5 y 3.5 μm . La pared celular es delgada, y carece de estructuras complejas como heterocistos (células especializadas para la fijación de nitrógeno) o acinetos (células de resistencia), aunque algunas especies pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas mediante otras estrategias (Morales & et al , 2025) .

2.2.1.2.Capacidad de producción de pigmentos en *Leptolyngbya lagerheimii*.

La producción de pigmentos en *Leptolyngbya lagerheimii* es altamente sensible a las condiciones ambientales. Factores como la cantidad e intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes, salinidad, pH del medio, temperatura; pueden modificar la expresión de genes relacionados con la síntesis de betacarotenos y

clorofila a. Bajo condiciones de baja iluminación *Leptolyngbya lagerheimii* aumenta el contenido de clorofila a para optimizar la captación de luz; mientras, que en ambientes con alta irradiancia, puede disminuir su concentración para evitar fotoinhibición, y aumentar la síntesis de pigmentos protectores como el betacaroteno (Mahanil & et al , 2022).

2.2.1.3.Potencial biotecnológico de *Leptolyngbya lagerheimii*.

Las cianobacterias están ganando especial atención debido a su fisiología única y la síntesis de compuestos bioactivos como lípidos, fenoles, alcaloides, pigmentos, vitaminas, proteínas, enzimas y citotoxinas. Estas biomoléculas pueden ser aprovechadas como biocombustibles, bioactivos antimicrobianos/antitumorales, protectores UV, para el crecimiento de cultivos y muchos otros elementos esenciales (Kumar & Rakwal, 2022).

La biomasa de microalgas y cianobacterias se puede cultivar en grandes cantidades, lo cual las hace atractivas para aprovechar su cultivo y con ello la extracción de compuestos bioactivos. Por esta razón, varias industrias han comenzado a estudiar el potencial de esta biomasa en una gran variedad de aplicaciones, como la producción de biocombustibles, la remediación ambiental de suelos y aguas contaminados, los complementos alimenticios y como fuente de alimento para la acuicultura (Odenthal & et al , 2024).

Producción de biocompuestos con aplicaciones médicas: Por su capacidad de sintetizar compuestos bioactivos con potencial antioxidante, antibacteriano, antifúngico e incluso anticancerígeno, por lo que pueden ser utilizados en el desarrollo de productos farmacéuticos, cosméticos y nutraceúticos (Nowruzzi & et al , 2020).

- **Biorremediación y tratamiento de aguas:** Debido a que tolera condiciones extremas de pH, salinidad y nutrientes limitados, *L. lagerheimii* se ha considerado como un bioagente para la biorremediación de aguas residuales, especialmente en ambientes contaminados con nitrógeno,

fósforo, metales pesados o contaminantes orgánicos (Tsolcha & et al , 2018).

- **Producción sostenible de biomasa:** Por la facilidad de cultivo, ya que se puede cultivar en fotobiorreactores ya sean cerrados o semiabiertos y su bajo costo de producción, su biomasa puede aprovecharse en la producción de biofertilizantes o bioestimulantes agrícolas, biocombustibles a partir de lípidos extracelulares, cultivos de microalgas simbióticas o mixtas en sistemas integrados (Kumar & et al , 2018).

En general, el potencial biotecnológico de *Leptolyngbya lagerheimii* radica en su versatilidad fisiológica y bioquímica, lo que la convierte en un microorganismo clave para el desarrollo de tecnologías sostenibles, de bajo impacto ambiental y con aplicaciones transversales en salud, energía, agricultura y medio ambiente.

2.3.Pigmentos fotosintéticos

Los pigmentos fotosintéticos son compuestos esenciales en organismos fototróficos, ya que permiten la captación de energía lumínica para su conversión en energía química durante la fotosíntesis. Tanto *Dunaliella salina*, como *Leptolyngbya lagerheimii*, poseen un conjunto de pigmentos adaptados a sus respectivos hábitats y estrategias fisiológicas. A pesar de compartir la función fotosintética, presentan diferencias clave en su composición pigmentaria, lo que influye directamente en su comportamiento ecológico, fotoadaptación y aplicaciones biotecnológicas (Shen & et al , 2022).

Las microalgas y cianobacterias poseen pigmentos como clorofila a y b que facilitan la fotosíntesis; carotenoides que incluyen β -caroteno, luteína, licopeno, astaxantina y fucoxantina; que no solo contribuyen a la fotosíntesis, sino que también actúan como antioxidantes y protectores contra la radiación ultravioleta (Saini & et al , 2018).

2.3.1. Betacarotenos

Los betacarotenos son pigmentos naturales que se encuentran en plantas y son conocidos por su capacidad antioxidante y su función como precursor de la vitamina A (Akram & et al , 2021). Estos compuestos han sido objeto de estudio debido a sus potenciales beneficios para la salud, incluyendo la prevención de enfermedades y el mantenimiento de la función cognitiva (Abrego & et al , 2023).

El betacaroteno es un precursor importante de la vitamina A, esencial para la salud visual y el sistema inmunológico y funciones antioxidantes, que protegen a las células del daño provocado por los radicales libres y el estrés oxidativo. Además, los betacarotenos tienen propiedades beneficiosas como reducir el riesgo de enfermedades crónicas, incluidas ciertas formas de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degenerativas (Huang & et al , 2023).

2.3.1.1. Estructura química del betacaroteno.

El beta-caroteno ($C_{40}H_{56}$) es un terpeno tetraterpenoide, compuesto por 40 átomos de carbono que forman una cadena lineal de dobles enlaces conjugados con dos ciclos beta-ionona en ambos extremos. Esta estructura completamente insaturada le confiere sus características ópticas y antioxidantes, y lo hace fuertemente absorbente en el espectro visible (Xu & et al , 2019).

El beta-caroteno puede existir en distintas formas geométricas (isómeros cis y trans), dependiendo de la configuración de los dobles enlaces. El isómero todo-trans es el más estable y el más abundante en la naturaleza, es la forma activa de provitamina A, pero bajo ciertas condiciones (luz, calor, disolventes orgánicos), puede isomerizarse a formas cis, que presentan menor actividad vitamínica, pero mayor capacidad antioxidante (Quevedo & et al , 2020).

2.3.1.2. Beneficios nutricionales y aplicaciones industriales de los betacarotenos

Al ser un precursor de la vitamina A, el betacaroteno cumple un papel importante en salud ocular; debido a su capacidad antioxidante combate radicales libres, que

está asociado a prevenir el daño celular y con ello a un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas (Tufail & et al , 2024)

El beta-caroteno es uno de los carotenoides más importantes en organismos fotosintéticos y destaca por su doble relevancia: nutricional y tecnológica. Su estructura química, altamente insaturada y conjugada, le otorga propiedades funcionales como antioxidante, precursor de vitamina A y colorante natural, lo que ha favorecido su uso en múltiples sectores industriales, desde la alimentación hasta la cosmética y la farmacéutica (Wang & et al , 2023).

La ingeniería metabólica ha mejorado su producción, ofreciendo una alternativa más sostenible y económica. Este compuesto se utiliza ampliamente en la industria alimentaria, médica y nutricional debido a sus propiedades antioxidantes que protegen lípidos, proteínas y ADN de daño oxidativo y su capacidad para ser convertido en vitamina A, que es muy importante ya que ayuda en la visión, la diferenciación y crecimiento celular, el sistema inmune (Harvey & Ben , 2020).

Industrialmente, el betacaroteno es aplicado en la industria alimentaria como colorante natural y aditivo nutricional, por lo que es muy utilizado en el desarrollo de alimentos funcionales; en la industria cosmética debido a su capacidad antioxidante es utilizado en la formulación de cremas y protectores solares; en la industria farmacéutica es comercializado como suplemento vitamínico. En el sector biotecnológico es utilizado como aditivo en alimentos balanceados para animales (Rifqui & et al , 2023).

2.3.2. Clorofilas a y b

Las clorofilas a y b son pigmentos esenciales en el proceso de fotosíntesis, permitiendo la conversión de energía lumínica en energía química. Ambos tipos de clorofila son necesarias para la captura de luz solar, aunque desempeñan roles complementarios y poseen características estructurales y funcionales diferenciadas (Agostini & et al, 2019).

La clorofila a es el pigmento principal involucrado en la fotosíntesis y se encuentra en todas las plantas, algas y cianobacterias. Su estructura molecular, caracterizada por un anillo de porfirina con un átomo de magnesio en su centro, es responsable de la absorción de luz en las longitudes de onda roja y azul-violeta del espectro electromagnético, la cual es la precursora de la fotosíntesis, ya que la energía captada por la clorofila a es utilizada directamente en las reacciones fotosintéticas que generan ATP y NADPH, compuestos esenciales para la síntesis de carbohidratos. Además, la clorofila a es la única involucrada directamente en la conversión de energía luminosa en energía química durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Pahlevan & et al , 2020).

La clorofila b, es un pigmento accesorio que se encuentra principalmente en las plantas y algas, pero no en las cianobacterias. Su estructura es similar a la de la clorofila a, con la diferencia de que su grupo funcional tiene una ligera variación que le permite absorber luz en el espectro azul y rojo-anaranjado. Esta actúa principalmente como un captador de luz adicional. Su función radica en captar la luz en longitudes de onda no absorbidas eficientemente por la clorofila a, ampliando así el rango de luz utilizable para la fotosíntesis. Posteriormente, la energía captada por la clorofila b se transfiere a la clorofila a, optimizando el proceso fotosintético y mejorando la eficiencia en condiciones de luz variable (Kume & et al , 2018).

2.3.2.1. Estructura química y propiedades de la clorofila a y b.

La clorofila a es el pigmento primario responsable de la captación de luz en el proceso de fotosíntesis. Su estructura química está basada en un anillo porfirínico, un compuesto cíclico compuesto por átomos de carbono, nitrógeno y un átomo central de magnesio (Mg). Este anillo, conocido como el anillo de porfirina, es el núcleo donde se realiza la absorción de luz. La fórmula molecular de la clorofila a es $C_{55}H_{72}MgN_4O_6$ (Fernández , 2012).

La estructura de la clorofila a se caracteriza por un ciclo tetrapirrólico que se une a un átomo de magnesio, que actúa como el centro de coordinación. Esta estructura permite que la clorofila a absorba eficientemente luz en las longitudes de onda del espectro electromagnético en las regiones roja (aproximadamente 660–680 nm) y

azul-violeta (aproximadamente 430–450 nm), lo que la convierte en un pigmento crucial para la fotosíntesis (Mizoguchi & et al , 2017).

La clorofila b comparte muchas similitudes con la clorofila a, ya que también tiene una estructura porfirínica con un átomo de magnesio en el centro, pero presenta una diferencia clave en su grupo funcional. En la clorofila b, el átomo de hidrógeno en el grupo metilo (-CH₃) de la clorofila a está sustituido por un grupo formilo (-CHO), lo que le confiere una ligera variación en su espectro de absorción. Esta modificación estructural le permite a la clorofila b absorber principalmente luz en las longitudes de onda azul (aproximadamente 455–475 nm) y roja-anaranjada (aproximadamente 600–650 nm), lo que la convierte en un pigmento accesorio complementario a la clorofila a (Hynninen & et al , 2025).

La fórmula molecular de la clorofila b es C₅₅H₇₂MgN₄O₇, presenta un átomo de oxígeno adicional en comparación con la clorofila a. Esta diferencia en la estructura de los grupos funcionales es responsable de las diferencias en sus propiedades ópticas y de absorción de luz (Queiroz & et al , 2017).

Las propiedades ópticas de la clorofila a y b están estrechamente relacionadas con su capacidad para absorber luz en el espectro visible. La clorofila a absorbe principalmente en las longitudes de onda roja (aproximadamente 660–680 nm) y azul-violeta (aproximadamente 430–450 nm), lo que resulta en la reflexión de luz verde, la cual es responsable del color característico de las plantas. La clorofila b, por su parte, absorbe principalmente en las regiones azul (aproximadamente 450–500 nm) y roja-anaranjada (aproximadamente 600–650 nm). Esta capacidad de absorción complementaria a la de la clorofila a le permite ampliar el rango de luz que las plantas pueden utilizar para la fotosíntesis, actuando como un pigmento accesorio que transfiere la energía captada a la clorofila a (Najdanova & et al , 2018).

2.3.2.2. Beneficios nutricionales y aplicaciones industriales de las clorofilas a y b.

Las clorofilas a y b al ser consumidas por el ser humano brinda propiedades antioxidantes, desintoxicantes, cicatrizantes y potenciadoras de la producción de sangre. Además, pueden contribuir a la pérdida de peso, actuar como desodorante natural y mejorar la digestión (Martins & et al, 2023).

Las clorofilas a y b son aprovechadas en distintas industrias, como la alimenticia que lo utiliza como colorante natural y la nutracéutica que aprovecha sus propiedades antioxidantes (Yang & et al , 2024).

En el área médica, la clorofila a y b por su capacidad antioxidante, tienen aplicaciones potenciales en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. La fototerapia usada en el tratamiento de heridas y quemaduras, aplicando tópicamente la clorofila, debido a sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas, ha mostrado ser eficaz en la aceleración de la cicatrización de la piel, además se la utiliza como ingrediente en la formulación de cosméticos (Wang & et al, 2021).

2.4. Análisis de materias primas

El realizar un análisis de las materias primas, es importante para determinar el contenido de ciertos componentes de interés que podrían ser aprovechados posteriormente, en el caso de *Dunaliella* (*Dunaliella salina*) y *Leptolyngbya* (*Leptolyngbya lagerheimii*), estudios sugieren que dependiendo de las condiciones a las que han sido expuestas durante su cultivo, incidirán en el contenido de antioxidantes y proteína (Ezquerro & Chan , 2021).

2.4.1. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se refiere al potencial de las sustancias para neutralizar o eliminar radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar daño celular a través del estrés oxidativo, protegiendo así las células de

procesos como la inflamación, el envejecimiento o enfermedades crónicas (Minerva & et al, 2025).

2.4.2. Contenido de proteína

El contenido de proteína es un análisis que permite evaluar el perfil de una muestra. Para determinar su contenido, se puede realizar mediante diferentes métodos los cuales miden el nitrógeno total de la muestra y luego se debe calcular el contenido proteico mediante un factor de conversión (Bernal & et al , 2024).

2.5. Técnicas de extracción

La extracción eficiente de betacarotenos y clorofilas a y b depende de diversos factores, como el tipo de material vegetal, el método de extracción empleado y las condiciones operativas. Por lo que, es muy importante encontrar los parámetros ideales para cada matriz.

2.5.1. Extracción con solventes orgánicos

La extracción con solventes orgánicos implica la utilización de disolventes polares y no polares, como el metanol, etanol, acetona, hexano, cloroformo y mezcla de estos, para disolver los pigmentos solubles en las células de las microalgas y cianobacterias (Li & et al , 2021).

Las microalgas y cianobacterias son lavadas para eliminar sales y liofilizadas, luego trituradas o homogeneizadas, y posteriormente se añaden los solventes seleccionados. La mezcla se agita o se mantiene en reposo para asegurar la disolución de los compuestos. Finalmente, el solvente se elimina mediante evaporación o filtración, dejando los pigmentos concentrados (Farobie & et al , 2023).

2.5.2. Extracción por Ultrasonido

La extracción ultrasónica, también conocida como extracción asistida por ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés), utiliza ondas de alta frecuencia para

inducir la cavitación en un líquido, lo que provoca la ruptura de las células microalgales y facilita la liberación de los pigmentos. Esta técnica ha ganado popularidad debido a su eficiencia y reducción en el uso de solventes (Fernandes & et al, 2024).

Las microalgas y cianobacterias se suspenden en un solvente adecuado y se exponen a ultrasonido a una frecuencia de 20-40 kHz. Este proceso genera burbujas en el líquido que se colapsan rápidamente, produciendo una presión y temperatura localizadas que inducen la disrupción celular y la liberación de los pigmentos (Bianchini & et al , 2024).

2.5.3. Factores que afectan la eficiencia de extracción.

La extracción eficiente de pigmentos naturales, tales como betacarotenos y clorofilas a y b, de microalgas como *Dunaliella* y *Leptolyngbya* es un proceso complejo que está influenciado por diversos factores. Estos factores incluyen las características de la microalga, el tipo de solvente utilizado, las condiciones operativas y las propiedades fisicoquímicas del medio de extracción. Una comprensión detallada de estos factores es esencial para optimizar los procesos de extracción y mejorar la calidad y el rendimiento de los compuestos deseados (Quiroz & Gutierréz, 2024).

2.5.3.1. Características físicas y químicas de la matriz celular

Las características estructurales y composicionales de las microalgas tienen un impacto directo en la eficiencia de la extracción. La matriz celular de *Dunaliella salina* y *Leptolyngbya lagerheimii* está compuesta por una pared celular y una membrana plasmática, cuya naturaleza influye en la liberación de pigmentos durante el proceso de extracción, ya que una estructura celular resistente y una pared celular más gruesa pueden requerir una mayor energía de ruptura, como el uso de ultrasonido, calor o enzimas, para liberar los pigmentos de manera eficiente (Sui & et al , 2021).

2.5.3.2. Tipo de solvente y proporción solvente-muestra

El solvente juega un papel crucial en la eficiencia de la extracción de pigmentos. La elección del solvente depende de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés (betacarotenos y clorofilas) y de la solubilidad de estos pigmentos en diferentes disolventes.

- **Polaridad del Solvente:** Los betacarotenos, al ser compuestos lipofílicos, se disuelven mejor en solventes no polares como el hexano, el cloroformo o una mezcla de estos con etanol o acetona. En cambio, las clorofilas a y b, que contienen grupos funcionales polares, se disuelven más eficientemente en solventes polares como el metanol, etanol o acetona (Mojaat & et al, 2008).
- **Mezclas de Solventes:** En algunos casos, el uso de mezclas de solventes polares y no polares mejora la extracción de los pigmentos al permitir que se disuelvan tanto los compuestos lipofílicos como los hidrofílicos. La proporción entre el solvente y la muestra también influye en la eficiencia de la extracción, ya que una mayor cantidad de solvente suele aumentar la extracción, pero también puede diluir el extracto (Sportiello & et al , 2024).

2.5.3.3. Temperatura y Tiempo de Extracción

La temperatura y el tiempo son dos parámetros críticos en los procesos de extracción, ya que pueden influir tanto en la solubilidad de los pigmentos como en la integridad de los mismos durante la extracción.

- **Temperatura:** La temperatura influye en la solubilidad de los pigmentos en el solvente y en la difusión de los compuestos desde la matriz celular hacia el solvente. Sin embargo, temperaturas excesivamente altas pueden degradar los pigmentos, especialmente el betacaroteno, que es sensible al calor y a la luz (Kumar & et al , 2024).
- **Tiempo de Extracción:** El tiempo de exposición del material biológico al solvente también es un factor importante. Si el tiempo es insuficiente, no se extraerán la totalidad de los pigmentos. Por otro lado, tiempos prolongados

pueden llevar a la degradación de los compuestos de interés o a la extracción de sustancias no deseadas, lo que puede disminuir la pureza del extracto (Ullah & et al , 2018).

2.5.3.4. Tamaño de partícula y pretratamientos

El tamaño de partícula de la biomasa es un factor crucial que determina la superficie de contacto entre el solvente y las células, afectando la eficiencia de la extracción.

- **Tamaño de Partícula:** Las células más pequeñas o aquellas que han sido fragmentadas tienen una mayor superficie expuesta al solvente, lo que facilita la liberación de pigmentos (Mellado & Hornero , 2017).
- **Pretratamientos Físicos y Químicos:** Los pretratamientos, como la lisis celular por ultrasonido, molienda, tratamiento térmico o el uso de enzimas, pueden facilitar la ruptura de la pared celular y liberar los pigmentos de manera más eficiente. La elección del pretratamiento adecuado depende de las características de las microalgas y de los pigmentos deseados (Shahram & Dinani, 2019).

2.5.3.5. pH del Solvente

El pH del solvente también puede influir en la solubilidad de los pigmentos, especialmente en el caso de las clorofilas. Las clorofilas, particularmente la clorofila a y b, son sensibles al pH, lo que puede afectar su estabilidad y solubilidad. En algunos casos, ajustar el pH del solvente puede aumentar la solubilidad de los pigmentos. Sin embargo, valores de pH muy ácidos o alcalinos pueden causar la descomposición de los pigmentos o su transformación en compuestos no deseados (Ruíz & et al , 2021).

2.6.Cromatografía Líquida de Alta Precisión HPLC (High – Performance Liquid Chromatography)

La cromatografía es una técnica analítica fundamental utilizada para la separación, identificación y cuantificación de compuestos. Su alta sensibilidad, precisión y

reproducibilidad la convierten en una herramienta indispensable en campos como la química analítica, la bioquímica y la industria farmacéutica (Sarria & et al, 2021).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) identifica los compuestos de una muestra y cuantifica su concentración. Los laboratorios aplican sistemas HPLC modernos para investigación y desarrollo, control de calidad, seguridad y validación (Fernandes & et al, 2020).

El principio básico de la HPLC se basa en la separación de los componentes de una mezcla debido a sus diferentes interacciones con una fase estacionaria y una fase móvil. La muestra se inyecta en un sistema de alta presión que impulsa una fase móvil líquida a través de una columna empacada con una fase estacionaria. A medida que los analitos se desplazan por la columna, experimentan distintas velocidades de migración debido a sus diferentes afinidades por las fases presentes, lo que permite su separación (Hussen, 2022).

2.6.1. Partes de un cromatógrafo

El equipo consta de una bomba de alta presión que proporciona un flujo constante y controlado de la fase móvil a través de la columna (rango de 0.1 a 1.0 mL/min); de un inyector que introduce la muestra (μL) en una fase móvil que transporta los analitos a través de una columna llena de una sustancia adsorbente. Los analitos se adsorben y desorben a diferentes velocidades a medida que fluyen por la columna y, de ese modo, se separan (Chakole & et al , 2021).

Los detectores registran una señal proporcional a la concentración del analito en la fase móvil y pasan los datos a un sistema de adquisición y procesamiento de datos que registra las señales del detector, grafica los cromatogramas y analiza cuantitativamente mediante integración de áreas bajo la curva (Schieppati & et al , 2021).

2.6.2. Fases móviles y estacionarias en Cromatografía Líquida de Alta Resolución

La fase estacionaria en HPLC está constituida por una matriz sólida inerte, usualmente sílica de alta pureza, sobre la cual se inmovilizan químicamente grupos funcionales que confieren propiedades específicas de retención. Existen diversos tipos de fases estacionarias, siendo las más utilizadas las de tipo fase reversa (RP-HPLC) y fase normal (NP-HPLC).

Fase Reversa (RP-HPLC): Es la más comúnmente empleada en la separación de compuestos orgánicos, particularmente pigmentos lipofílicos como carotenoides y clorofilas. En esta modalidad, la fase estacionaria está funcionalizada con grupos apolares, generalmente octadecil (C18) o octil (C8), lo que permite la retención de compuestos hidrofóbicos mediante interacciones hidrofóbicas. Las columnas C18 ofrecen una excelente resolución para betacarotenos, clorofila a y b, debido a su afinidad por compuestos no polares o moderadamente polares (Tome & et al , 2020).

Fase Normal (NP-HPLC): Emplea una fase estacionaria polar (como sílica sin modificar), siendo útil para compuestos polares. No obstante, su uso en el análisis de pigmentos naturales es menos frecuente, dado que muchos pigmentos presentan baja solubilidad en fases móviles no acuosas típicas de esta modalidad (Zhao & et al , 2022).

Columnas Especializadas: En algunos casos, se emplean columnas con fases estacionarias modificadas para la separación de isómeros geométricos de carotenoides o para pigmentos sensibles, como aquellas con grupos fenil, ciano o amidas, que ofrecen selectividades distintas basadas en mecanismos π - π , dipolo-dipolo o de exclusión estérica (Roziing, 2021).

La fase móvil en HPLC es una mezcla líquida que actúa como vehículo para transportar los analitos a través de la columna cromatográfica. La composición de la fase móvil se selecciona de acuerdo con la fase estacionaria y la naturaleza de los compuestos a separar (Benítez & et al , 2025).

En fase reversa, se utilizan comúnmente mezclas de solventes orgánicos con agua o tampones acuosos. Los solventes típicos incluyen metanol, acetonitrilo, acetona y tetrahydrofuran, agua o tampones acuosos (Wang & et al , 2024).

En el modo isocrático, la composición de la fase móvil permanece constante durante toda la corrida cromatográfica, siendo adecuado para muestras con pocos componentes de polaridad similar (Ranjbarian & et al , 2021).

En el modo de gradiente, la polaridad de la fase móvil varía progresivamente, lo que permite la elución eficiente de compuestos con una amplia gama de polaridades. Este modo es particularmente útil en mezclas complejas de pigmentos como extractos de microalgas, donde coexisten carotenoides, clorofilas y otros metabolitos secundarios (Mammone & et al , 2023).

La selección de las fases móvil y estacionaria debe garantizar una adecuada separación, minimizar el tiempo de análisis y preservar la estabilidad de los compuestos.

2.6.3. Detector DAD

El detector de arreglo de fotodiodos (DAD, por sus siglas Diode Array Detector) es un tipo de detector espectrofotométrico ampliamente empleado en los sistemas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), debido a su capacidad para adquirir información espectral completa de los analitos en tiempo real. Su principal ventaja radica en la posibilidad de monitorear simultáneamente múltiples longitudes de onda, lo cual es especialmente útil en el análisis de mezclas complejas de compuestos con distintas propiedades de absorción, como los pigmentos fotosintéticos (Zapata & et al , 2024).

2.6.3.1.Principio de Funcionamiento

El DAD opera con base en la absorbancia de radiación ultravioleta-visible (UV-Vis) por parte de los analitos al atravesar una celda de flujo óptica. La luz emitida por una lámpara (generalmente de deuterio y tungsteno) es dirigida a través de la celda, donde interacciona con el eluyente proveniente de la columna

cromatográfica. Posteriormente, la luz es dispersada por un sistema de rejillas y proyectada sobre una serie de fotodiodos dispuestos linealmente, cada uno de los cuales detecta una longitud de onda específica dentro de un rango definido (usualmente entre 190 y 800 nm) (Ulate & et al , 2019).

Esta disposición permite obtener un espectro completo de absorbancia para cada punto del cromatograma, lo que proporciona información adicional sobre la identidad y la pureza de los picos cromatográficos. Además, facilita la detección de coeluciones y permite realizar análisis cualitativos y cuantitativos más robustos que los detectores de longitud de onda fija o variable (UV/Vis tradicionales) (Székelyhidi & et al , 2023).

2.6.4. Parámetros cromatográficos claves

En la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), el rendimiento del sistema analítico depende de diversos parámetros cromatográficos que determinan la calidad de la separación, la reproducibilidad del método y la precisión de los resultados. El control de estos parámetros es esencial para el desarrollo, validación y aplicación de métodos cromatográficos, particularmente en el análisis de compuestos bioactivos como pigmentos fotosintéticos (betacarotenos, clorofila a y b).

El tiempo de retención es el tiempo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta la detección de un analito específico. Este parámetro es característico de cada compuesto bajo condiciones cromatográficas constantes y se utiliza para la identificación cualitativa de los analitos. Una buena separación requiere que los tiempos de retención entre compuestos sean suficientemente distintos para evitar solapamientos (Zhi & et al , 2024).

El factor de capacidad o factor de retención, es la relación del tiempo de retención del analito y el tiempo de paso de un compuesto, la resolución mide el grado de separación entre dos picos cercanos en el cromatograma, otro punto importante es la simetría de los picos, ya que la presencia de picos con cola o frente pueden indicar problemas con la columna o el método (Bedogni & et al , 2024).

El sistema HPLC trabaja a alta presión (entre 20 y 400 bar), dependiendo del flujo, viscosidad de la fase móvil, longitud y tipo de columna. Un aumento inesperado en la presión puede indicar obstrucciones, degradación de la columna o incompatibilidad con los solventes utilizados (Kumar & et al , 2014).

El flujo afecta directamente el tiempo de análisis y la resolución. Un flujo demasiado alto puede reducir la calidad de separación, mientras que uno demasiado bajo prolonga el análisis y aumenta el ensanchamiento de los picos. Generalmente se emplean flujos entre 0,5 y 1,5 mL/min en columnas estándar de 4,6 mm de diámetro interno.

El control de la temperatura de la columna es importante para mantener la reproducibilidad de los tiempos de retención y mejorar la eficiencia de la separación. Aunque muchos métodos se ejecutan a temperatura ambiente, el uso de un horno para columnas permite estabilizar condiciones y reducir la viscosidad de la fase móvil.

2.6.5. Cuantificación

Las curvas de calibración representan una herramienta fundamental en los análisis cuantitativos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), permitiendo establecer la relación entre la concentración de un analito y la respuesta instrumental obtenida, comúnmente expresada como el área bajo el pico cromatográfico. Este procedimiento es esencial para la cuantificación precisa de compuestos de interés.

2.6.5.1. Fundamento y Objetivo de la Calibración

El propósito de una curva de calibración es correlacionar, bajo condiciones cromatográficas constantes, la señal del detector con diferentes concentraciones conocidas de un analito estándar. Este modelo permite extrapolar la concentración de un compuesto desconocido en una muestra problema mediante interpolación dentro del rango de la curva.

El procedimiento implica la preparación de una serie de soluciones estándar de concentración conocida, que se inyectan en el sistema cromatográfico bajo condiciones idénticas a las empleadas en el análisis de las muestras. La respuesta del detector, normalmente expresada como el área o la altura del pico, se grafica frente a la concentración correspondiente. Generalmente, se aplica un modelo de regresión lineal, aunque pueden emplearse modelos no lineales si así lo requieren los datos.

2.6.5.2. Construcción de la Curva de Calibración

Se preparan soluciones patrón del analito en un rango de concentraciones, abarcando tanto valores bajos como altos, para cubrir más rango de detección del método; y se lleva a analizar por HPLC con el método establecido por triplicado cada una de las soluciones para mayor confiabilidad; los resultados se llevan a un software para elaborar la curva de calibración y con esta obtener una ecuación lineal y el valor de R^2 .

2.6.5.3. Consideraciones

- **Repetibilidad:** Se recomienda realizar inyecciones por duplicado o triplicado para cada punto de la curva, a fin de reducir errores y mejorar la precisión.
- **Matriz del solvente:** La matriz utilizada para diluir los estándares debe ser compatible con la fase móvil y representar, en lo posible, la composición del extracto real, a fin de minimizar efectos de matriz en la respuesta.
- **Almacenamiento de estándares:** Dado que muchos pigmentos naturales son sensibles a la luz, temperatura y oxidación, los estándares deben conservarse en condiciones controladas (temperatura baja, ausencia de luz y en atmósfera inerte si es necesario) y utilizarse en un tiempo limitado.
- **Curvas independientes por compuesto:** Dado que cada pigmento tiene diferentes coeficientes de absorción y tiempos de retención, se requiere la construcción de curvas de calibración independientes para betacaroteno, clorofila a y clorofila b.

2.6.5.4. Aplicación en el Análisis de Muestras

Una vez validada la curva de calibración, se procede a la cuantificación de los pigmentos en las muestras problema. El área del pico correspondiente al compuesto de interés se interpolará en la curva respectiva, obteniendo así la concentración en la muestra. En caso de diluciones, se aplicarán los respectivos factores de corrección.

2.6.6. Cromatogramas

Los cromatogramas generados mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) constituyen la principal fuente de información cualitativa y cuantitativa en el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos, el análisis de los cromatogramas permite evaluar tanto la eficiencia del método de separación como la concentración de los analitos en las muestras extraídas.

2.6.6.1. Elementos del Cromatograma

Un cromatograma es una representación gráfica de la señal del detector en función del tiempo. Cada pico registrado corresponde a un compuesto que ha sido separado por la columna cromatográfica y posteriormente detectado por el sistema.

Los principales elementos a considerar en un cromatograma son:

- **Tiempo de retención (t_R):** Tiempo transcurrido desde la inyección hasta la aparición del máximo de un pico, característico para cada compuesto bajo condiciones experimentales constantes.
- **Área del pico:** Proporcional a la cantidad del analito presente en la muestra; se utiliza para la cuantificación mediante curvas de calibración.
- **Forma del pico:** La simetría y la resolución entre picos reflejan la calidad del sistema de separación.
- **Ruido de base:** Puede interferir en la identificación de compuestos en bajas concentraciones y debe mantenerse mínimo para garantizar una buena relación señal/ruido.

2.6.6.2. Calidad Cromatográfica

Los cromatogramas obtenidos muestran picos bien definidos, con buena resolución entre los compuestos analizados. La ausencia de solapamientos entre los picos principales indica que las condiciones cromatográficas utilizadas fueron adecuadas para lograr una separación eficiente. Asimismo, la simetría de los picos fue satisfactoria, sin evidencia significativa de colas o frentes, lo que refleja una buena integridad del sistema cromatográfico.

2.6.6.3. Análisis Cuantitativo

Mediante la integración del área bajo cada pico y su correspondiente interpolación en la curva de calibración específica, se determinaron las concentraciones de betacaroteno, clorofila a y clorofila b en las muestras analizadas. Este procedimiento permitió comparar la productividad pigmentaria entre cepas y condiciones de cultivo, así como evaluar el impacto de los métodos de extracción utilizados.

2.7. Diseño de productos agroindustriales

El diseño de productos agroindustriales surge de aprovechar las materias primas ya sean de origen animal, vegetal o microbiológico para satisfacer las necesidades del mercado. Un punto clave en el desarrollo de los productos agroindustriales es la innovación, ya sea en características, funciones, diseño o rendimiento; mejorando productos existentes o creando uno completamente nuevo (Vargas & et al , 2025).

Una vez identificada una necesidad o demanda específica se debe analizar las propiedades de la materia prima disponible, las tecnologías apropiadas de procesamiento, el cumplimiento de normativas sanitarias y de calidad, así como el desarrollo de un empaque adecuado que preserve el producto y facilite su distribución y consumo. Todo esto debe integrarse bajo un enfoque sistemático, donde se consideren factores como la estacionalidad de las materias primas, el abastecimiento sostenible, el impacto ambiental y el comportamiento del mercado (Zaruma & et al, 2024).

El proceso de diseño se divide en varias etapas, entre las cuales destacan: la ideación y formulación del producto, que incluye estudios sobre la viabilidad técnica y sensorial del mismo; el diseño del proceso de producción, donde se definen las condiciones óptimas de operación, equipos requeridos y parámetros de control; y el diseño del empaque y etiquetado, que debe cumplir funciones de protección, conservación e información, además de consideraciones estéticas y de marketing (Muñoz , 2015).

En la actualidad, el diseño de productos agroindustriales se ve influenciado por tendencias globales como el consumo responsable, la salud y el bienestar, la reducción del desperdicio alimentario y el aprovechamiento de subproductos. En este contexto, se valora cada vez más el desarrollo de productos funcionales, orgánicos, de origen local o con menor huella ambiental. Así, la innovación en este ámbito no solo responde a parámetros tecnológicos, sino también a factores culturales, sociales y ecológicos (Ramírez & et al , 2024).

Además, la implementación de herramientas como el análisis sensorial, el estudio de vida útil, y el uso de modelos predictivos para determinar el comportamiento del producto en diferentes condiciones de almacenamiento, refuerzan el carácter científico y riguroso del proceso de diseño. También se ha incrementado el uso de metodologías de diseño centradas en el usuario, como el diseño participativo o el design thinking, que permiten comprender mejor las necesidades del consumidor y crear productos más competitivos y sostenibles.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Ubicación de la investigación

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Investigación y Vinculación de la Universidad Estatal de Bolívar, en el departamento de Cromatografía Líquida HPLC.

3.1.1. Localización de la investigación

Tabla 3

Localización de la investigación

Provincia	Bolívar
Cantón	Guaranda
Parroquia	Gabriel Ignacio Veintimilla
Sector	Laguacoto II
Dirección	Laguacoto II. (Guaranda Km. 1 ½ vía San Simón)

3.1.2. Situación geográfica y climática de la localidad

Tabla 4

Parámetros climáticos del territorio

Parámetros	Valores
Altitud promedio	2.604 msnm
Latitud	01° 36' 52" sur
Longitud	78° 59' 54" oeste
Temperatura máxima	21 °C
Temperatura mínima	7 °C
Temperatura media	14,4 °C
Precipitación media anual	980 mm

Humedad relativa	70%
Heliofanía promedio	900 horas/luz/año
Velocidad de viento	6 m/s

Nota. Tomado de Estación Meteorológica Laguacoto II. UEB 2019 y 2021.

3.1.3. Zona de vida

La ubicación del lugar donde se desarrolló la investigación se encuentra en la zona de vida según Holdridge, L. bosque Seco Montano Bajo (bs-MB).

3.2. Metodología

3.2.1. Material en estudio

Las muestras de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*) en estado vegetativo fueron proporcionadas por la Universidad Península de Santa Elena (UPSE), dentro del convenio del Proyecto de Investigación CEDIA “Dietas funcionales basadas en carotenoides derivados de dos especies de microalgas para mejorar la productividad y salud de peces (*Oncorhynchus mykiss*) en etapas iniciales”.

3.2.1.1. Equipos de laboratorio

- Cromatógrafo Líquido (HPLC)
- Centrífuga
- Microcentrífuga
- Espectrofotómetro
- Liofilizador
- Autoclave
- Balanza analítica
- Vortex
- Analizador elemental
- Baño ultrasónico
- Bomba de vacío

- Cabina extractora

3.2.1.2.Materiales

- Vasos de precipitación.
- Tubos eppendorf
- Tubos eppendorf ámbar
- Perlas de acero inoxidable
- Guantes.
- Alcohol.
- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Micropipetas.
- Puntillas
- Viales
- Filtros
- Jeringas
- Membranas filtrantes

3.2.1.3.Reactivos para obtención de extractos

- Suero fisiológico
- Metanol
- Acetona
- Cloroformo

3.2.1.4.Reactivos para HPLC

- Metanol
- Etil acetato
- Estándar de betacaroteno
- Estándar de clorofila a
- Estándar de clorofila b

3.2.1.5. Reactivos para DPPH

- DPPH
- Trolox estándar
- Metanol

3.2.2. Factores en estudio

Los factores considerados para la determinación y cuantificación de betacarotenos, clorofila a y b en la microalga *Dunaliella salina* y la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* son Factor A: Microalga y cianobacteria y Factor B: Método de extracción.

Tabla 5

Factores de estudio

Factores	Código	Niveles
Microalga y cianobacteria	A	a ₁ : <i>Dunaliella</i> (<i>Dunaliella salina</i>) a ₂ : Lepto (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> .)
Método de extracción	B	b ₁ : Método CIBPA b ₂ : Método LAP

3.2.3. Tratamientos

Los tratamientos componen la combinación de cada uno de los niveles de los factores A y B que interaccionan en el estudio.

Tabla 6

Combinación de tratamientos de los factores

Tratamiento	Código	Niveles	
		Factor A	Factor B
1	a ₁ b ₁	<i>Dunaliella salina</i>	Método CIBPA
2	a ₁ b ₂	<i>Dunaliella salina</i>	Método LAP

3	a ₂ b ₁	<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> .	Método CIBPA
4	a ₂ b ₂	<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> .	Método LAP

3.2.4. Características del experimento

Se detalla los números de factores, niveles, réplicas, el tamaño de muestra y las variables respuesta.

Tabla 7

Características del experimento

Características	Cantidad
Unidad experimental	5 mL
Número de factores experimentales	2
Niveles factor A	2
Niveles factor B	2
Número de repeticiones	3
Número de unidades experimentales	12
Variables respuesta	3

Nota: Las variables respuesta son el contenido de betacarotenos, clorofila a y b.

3.2.5. Tipo de diseño experimental o estadístico

Se aplicó un Diseño factorial 2² el modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

μ : media general

α_i : efecto debido al i-ésimo nivel del factor A

β_j : efecto del j-ésimo nivel del factor B

$(\alpha\beta)_{ij}$: efecto de interacción en la combinación ij

ϵ_{ij} : error aleatorio

3.2.6. Manejo de la investigación

Los métodos de ensayo que se usaron para la preparación de las muestras de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*) que fueron analizadas en el equipo HPLC.

3.2.6.1. Análisis de antioxidantes mediante DPPH

Se preparó el reactivo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) a una concentración de 0,1 mM, para ello se pesó la cantidad necesaria de reactivo según la cantidad de muestras a analizar, y se disolvió con metanol, se conservó en oscuridad. Se preparó el estándar de Trolox con el cual se elaboró soluciones a diferentes concentraciones y un blanco, con los datos se elaboraron la curva de calibración. Una vez listas las soluciones reposaron durante 35 minutos a oscuras, pasado este tiempo se procedió a medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 515 nm.

Para medir las muestras, se consideraron las características de éstas, ya que de ser necesario algunas requieren diluciones, se utilizaron los extractos del diseño experimental que no requirieron diluciones, se prepararon soluciones del reactivo DPPH y de las muestras, se dejó reposar a oscuras durante 35 minutos, para proceder a leer en el espectrofotómetro (Rumpf & et al, 2023).

3.2.6.2. Análisis de proteínas mediante DUMAS

El método Dumas consiste en la combustión de una muestra de masa conocida a alta temperatura en presencia de oxígeno; los gases producidos se reducen con cobre y se secan, mientras que el CO₂ queda atrapado.

La muestra homogeneizada se combustiona con la adición de oxígeno puro (O₂) en un horno de alta temperatura a unos 1000 °C. La mezcla gaseosa obtenida, compuesta por agua, dióxido de carbono, óxidos de nitrógeno y nitrógeno, pasa por

el sistema mediante un gas portador, normalmente helio. Durante el proceso, los óxidos de nitrógeno se reducen a nitrógeno elemental en una superficie de cobre y el agua y el dióxido de carbono se separan mediante trampas específicas. El gas portador fluye por todo el sistema de principio a fin durante el análisis y se mide con un detector de conductividad térmica (TCD) (Nwachukwu & Aluko, 2019)

3.2.6.3.Lavado de muestras.

Las muestras de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*,) fueron cultivadas en agua salada, por lo que fueron lavadas para eliminar residuos de sales que podrían interferir en el análisis de cromatografía.

Se pesaron 30 mg de biomasa seca de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*,) se depositaron en tubos de vidrio con tapa rosca, se añadió 1 mL de agua destilada o suero fisiológico, se vortexó durante 1 minuto y se centrifugó a 3500 rpm durante 3 minutos; se eliminó el sobrenadante y se repitió dos veces el lavado. Eliminada la mayoría del sobrenadante se guardó a -20°C durante 48-72 horas, liofilizó la muestra en condiciones estándar del equipo.

3.2.6.4.Método de extracción CIBPA.

El método de extracción, cuantificación e identificación de betacarotenos de (Vidussi & et al , 1996):

La pastilla celular lavada y liofilizada se le añadió 1 mL de acetona fría de grado HPLC al 100%, se vortexó durante 30 segundos y se llevó al baño ultrasónico durante 3 minutos se guardó a -20°C por 48-72 horas.

Transcurrido el tiempo, se llevó al baño ultrasónico por 3 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 10 °C, se recolectó el sobrenadante en un balón de aforo de 5 mL con tapa, la pastilla celular se le añadió 1 mL de acetona fría al 100% de grado HPLC, se vortexó durante tres minutos, se llevó al baño ultrasónico durante 3 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 10°C, se recolectó el

volumen en el balón y se repitió este proceso hasta que la pastilla celular perdió su color, terminado el proceso se aforó el balón, se tapó y se cubrió con parafilm para guardar los extractos a -20°C hasta cuando se utilizaron.

3.2.6.5. Método de extracción Laboratory Analytical Procedure (LAP)

El método aplicado por (Rowland & et al , 2022), se detalla a continuación:

Se pesaron 50 mg de muestra en un tubo eppendor ámbar y se añadió 10 perlas de acero inoxidable se vortexeó durante 1 minuto; se pesó 15 mg de muestra en un tubo eppendor ámbar y se cubrió con parafilm y se guardó a -20°C. Se añadió 100 µL de agua destilada tipo I, se vortexeó durante 15 segundos y se refrigeró durante 30 minutos; pasado el tiempo, añadir 500 µL de metanol, vortexear durante 15 segundos, se añadió 500 µL de cloroformo, se vortexeó 15 segundos y llevar a centrifugar 5 minutos a 5000 rcf a 10°C, extraer el sobrenadante en un balón de aforo de 5 mL con tapa, se repitió el procedimiento de añadir metanol cinco veces, aforar el balón para poder pasar las muestras a tubos de vidrio ámbar con tapa para cubrirlos con parafilm para guardarlos a -20°C.

3.2.7. Métodos de evaluación

3.2.7.1. Contenido de antioxidantes

El contenido de antioxidantes de las muestras de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*), se determinó mediante espectrofotometría con el espectrofotómetro NanoDrop One de Thermo Scientific, con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) se utilizaron los extractos de los tratamientos del diseño experimental.

3.2.7.2. Contenido de proteína

Para determinar el contenido de proteína de las muestras de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*), se utilizó aproximadamente 1 a 2 gramos de muestra, se llevó al analizador elemental

3.2.7.3. Análisis cromatográficos

Para la determinación del contenido de betacarotenos, clorofila a y b de las muestras de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, se partió de los extractos obtenidos de los tratamientos del diseño experimental.

Se utilizó un cromatógrafo HPLC 1260 Infinity con un detector DAD 1290 Infinity, la columna utilizada Kinetex 5µm EVO C18 100 A 150x4,6 mm, los solventes utilizados en la fase móvil fueron metanol y etilacetato de grado HPLC, la columna se conservó en acetonitrilo de grado HPLC y agua tipo I (80:20 v/v) considerando las recomendaciones del fabricante. Todos los volúmenes de los solventes de la fase móvil fueron filtrados y desgasificados antes de su ingreso al equipo, ya que, si se omite ese paso el equipo puede fallar.

Previo a encender el equipo, se debe verificar que la fase móvil contenga volúmenes óptimos de solventes, al encender el equipo se debe dejar aproximadamente una hora para que pueda purgar el aire de las tuberías.

Antes de analizar las muestras, se debe hacer una curva de calibración con estándares a diferentes concentraciones en el caso de esta investigación los estándares utilizados fueron de la marca SIGMA-ALDRICH de betacaroteno, clorofila a y b, esto con la finalidad de que cuando se proceda a analizar las muestras tengamos información sobre a partir de las concentraciones el equipo detecta y el tiempo de retención en el que el equipo identificó el analito, con estos datos graficamos la curva estándar, de la cual usamos el valor numérico de la pendiente y el intercepto de la curva que se utilizó para la cuantificación de betacarotenos, clorofila a y b.

Los extractos se deben mantener refrigerados, una vez listo el equipo, si se considera conveniente se puede hacer diluciones de los extractos con la finalidad de que no esté tan concentrado e interfiera en la integridad de la columna, se tomó aproximadamente 1,5 mL de extracto, se filtró en un vial y se llevó a al equipo para que el inyector tome la muestra y el equipo identificó los analitos de interés.

Finalizado el tiempo del cromatograma, verificamos los tiempos de retención en los que se formaron los picos y los comparamos con los estándares, de esta manera identificamos la presencia de betacaroteno, clorofila a y b de los extractos. Para poder cuantificar los analitos, revisamos los resultados del software del HPLC consideramos el área de la curva, si se realizó o no dilución, el volumen total del extracto, el peso inicial de la muestra seca, la pendiente e intercepto de la curva de calibración; toda la información numérica se condensa en una hoja de cálculo para obtener el contenido total de betacaroteno, clorofila a y b de las muestras de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y de la cianobacteria *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*),

3.2.8. Análisis de datos

Los datos se analizaron en el software Statgraphics Centurion 19, mediante el análisis de varianza (ANOVA), se determinarán los efectos significativos de los factores y su interacción. En caso de diferencias significativas se aplicó una prueba de comparación de medias (Tukey o LSD).

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Contenido de antioxidantes

En la tabla 8 se reportan los resultados de la cantidad de antioxidantes de las muestras de la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii.*), los extractos utilizados para el análisis se obtuvieron con los métodos de extracción CIBPA y LAP que fueron analizados mediante DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).

Tabla 8

Resultados del contenido de antioxidantes mediante DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo)

Muestra	Método de extracción	Contenido de antioxidantes ($\mu\text{mol ET/g muestra}$)
Dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>)	Método CIBPA	23,11
	Método LAP	130,41
Lepto (<i>Leptolyngbya lagerheimii.</i>)	Método CIBPA	ND
	Método LAP	ND

Con base a los resultados del análisis del contenido de antioxidantes mediante DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) de los extractos de las muestras de la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii.*), se determinó que la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) posee mayor capacidad antioxidante a comparación de la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii.*), lo cual concuerda con el estudio de Andriopoulos & et al (2022) quienes obtuvieron resultados similares.

El estudio de la capacidad antioxidante de las materias primas es importante, ya que la agroindustria busca aprovechar estas características para diseñar productos que aprovechen las mismas, brindando a las personas productos innovadores que

satisfagan sus necesidades. Hay que considerar que la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) se encuentra en estado vegetativo, por lo que se atribuye su bajo contenido de antioxidantes.

4.1.2. Contenido de proteína

En la tabla 9 se reportan los resultados del contenido de proteína de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*.) que se determinó mediante el método Dumas.

Tabla 9

Resultados de contenido de proteína mediante el método DUMAS

Muestra	Contenido de proteína total (%)
Dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>)	11,25
Lepto (<i>Leptolyngbya lagerheimii</i> .)	9,16

El contenido de proteína de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) es mayor que el de la cianobacteria *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) en un estudio realizado por Lanza & et al (2016) corroboraron que no existe diferencia significativa entre el análisis del contenido de proteínas mediante los métodos Kjeldahl y Dumas, lo que facilita la comparación con el estudio realizado por Andriopoulos & et al (2022) quienes analizaron el contenido de proteína mediante el método Kjeldahl de la microalga *Dunaliella salina* y obtuvieron 36.72 ± 5.05 % de proteína.

A pesar de que el contenido proteico de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) no es muy alto, se lo podría considerar como una fuente complementaria, ya que, en la actualidad las tendencias de mercado apuntan hacia el desarrollo de productos innovadores y que su cadena de producción sea más limpia, en el caso de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*) cumple con lo mencionado, debido a que para su producción no requiere de mucho espacio y recursos.

4.1.3. Condiciones de HPLC

El equipo utilizado para el desarrollo del estudio fue HPLC 1260 Infinity, de la marca Agilent Technologies, el detector DAD 400-500 NM, en la tabla 10 se detallan la columna y demás parámetros del método utilizado para la determinación de betacarotenos, clorofila a y b.

Tabla 10

Método para el análisis de betacaroteno, clorofila a y b

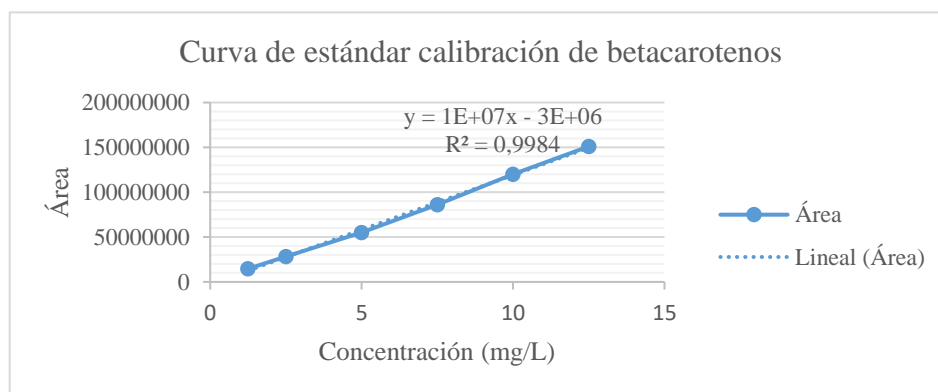
Columna	Kinetex 5µm EVO C18 100 A 150x4,6 mm
Fase móvil	80% Metanol: 20% Acetato de Etilo
Flujo	1,0 mL/min
Temperatura columna	25°C
Volumen de inyección	8µL
Tiempo de corrida	10 min

4.1.4. Cuantificación del contenido de betacarotenos presente en las muestras de *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) mediante HPLC

Para poder cuantificar el contenido de betacarotenos, se elaboró una curva de calibración con un estándar de betacaroteno a diferentes concentraciones.

Figura 3

Curva de estándar de calibración de betacarotenos



El resultado del análisis del contenido de betacarotenos mediante HPLC de los extractos de las muestras de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* se detalla en la tabla 11.

Tabla 11

Contenido de betacarotenos

Muestra	Método de extracción	Contenido de betacarotenos (mg βcaroteno/g muestra)
Dunaliella salina	Método CIBPA	4,01
(<i>Dunaliella salina</i>)	Método LAP	10,36
Lepto (<i>Leptolyngbya</i>	Método CIBPA	ND
<i>lagerheimii.</i>)	Método LAP	0,57

Con base en los resultados del contenido de betacarotenos, se extrajo un mayor contenido de betacarotenos de la microalga *Dunaliella salina* con el método de extracción LAP, casi el doble de lo que se extrajo con el método CIBPA.

En el estudio de Nguyen y colaboradores (2025), determinaron el contenido de betacarotenos de la microalga *Dunaliella salina* mediante HPLC, en su estudio obtuvieron 0,117 mg de betacaroteno/g de muestra resultados con condiciones similares a los del presente estudio. En cuanto al contenido de betacarotenos de la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* en el estudio de Lopes y colaboradores (2020) obtuvieron 1,259 μg betacaroteno/ mg de muestra en extractos de etanol 70% de la cianobacteria *Nodosilinea (Leptolyngbya)* antártica, resultados comparables.

Tabla 12

ANOVA del contenido de betacarotenos

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	-------	----------------	---------	---------

A: Microalga y Cianobacteria	142,968	1	142,968	536130,12	0,0000
B: Método de extracción	35,9148	1	35,9148	134680,50	0,0000
AB	25,1141	1	25,1141	94178,00	0,0000
Error total	0,00213333	8	0,000266667		
Total (corr.)	203,999	11			

Según el análisis de varianza (ANOVA) realizado tanto el factor A: microalga y cianobacteria y el factor B: métodos de extracción tienen un efecto significativo sobre el contenido de betacarotenos, ya que los valores -p son inferiores a 0,05, lo que indica diferencias significativas en las variables analizadas.

En el estudio realizado por Araj-Shirvani & et al (2024) en el cual analizaron el contenido de betacarotenos presentes en la microalga *Dunaliella salina* reportaron valores de 5,28 mg de betacarotenos/ g de muestra, mientras que en el presente estudio la microalga *Dunaliella salina* obtuvo valores de 10,36 mg de betacarotenos/ g de muestra, los altos valores del estudio se pueden deber a los diferentes métodos de extracción.

La ecuación del modelo ajustado es:

$$\text{Contenido de betacaroteno} = 3,735 - 3,45167*(A) + 1,73*(B) - 1,44667*(A)*(B)$$

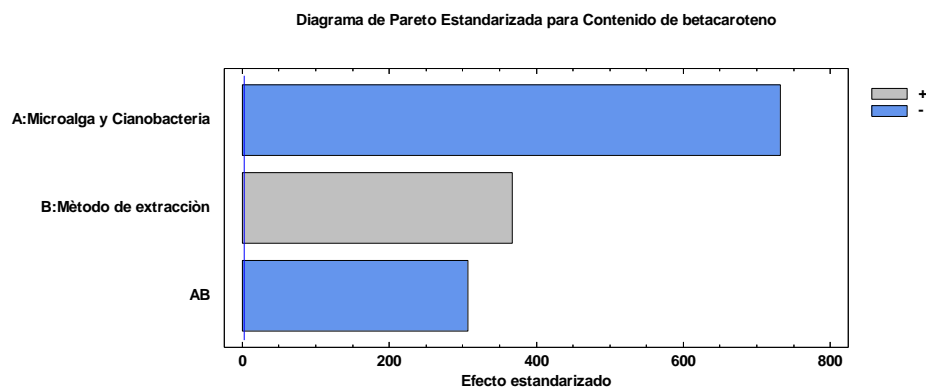
El modelo ajustado indica que la selección de la microalga o cianobacteria es el factor con mayor peso en la variación del contenido de betacaroteno, seguido por el método de extracción y, en menor medida, por la interacción entre ambos factores. La tendencia negativa de A y AB evidencia que, aunque la técnica de extracción puede favorecer la recuperación del compuesto, la naturaleza biológica del organismo ejerce una influencia importante y, en ciertos casos, puede limitar la eficacia del método empleado en la concentración final de betacaroteno.

El método de extracción incide significativamente en el contenido de betacarotenos de los extractos de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria

lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*), cuyos extractos fueron analizado mediante HPLC.

Figura 4

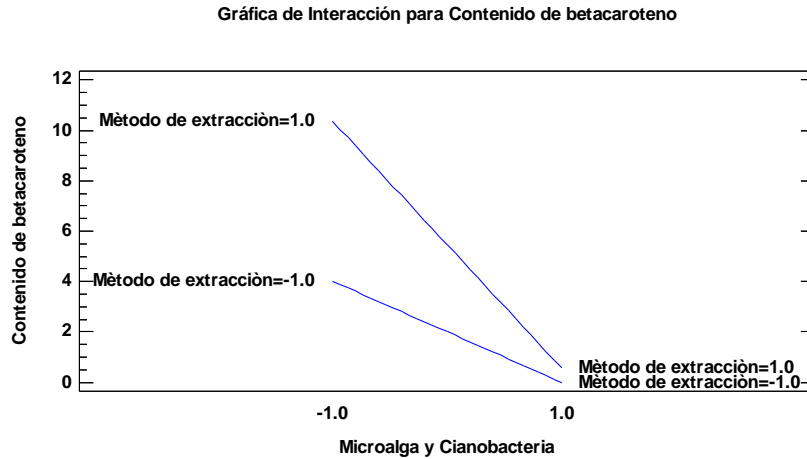
Diagrama de Pareto del contenido de betacaroteno de la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y de la cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*)



El tipo de organismo microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) o cianobacteria lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*) es el factor más determinante en la producción de betacaroteno. El método de extracción (B) también influye de manera significativa, pero en menor medida. La interacción (AB) no es tan fuerte, aunque sí afecta los resultados. Es decir, para maximizar el contenido de betacaroteno es más relevante elegir adecuadamente la microalga o cianobacteria y luego optimizar el método de extracción.

Figura 5

Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de betacarotenos



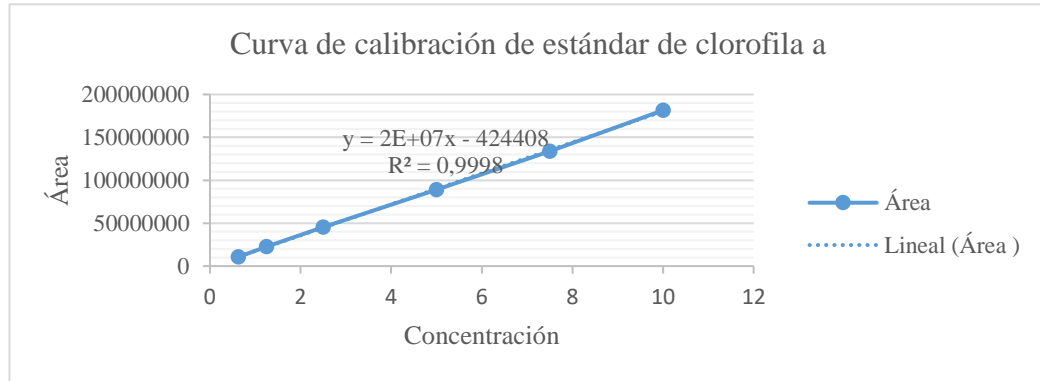
La figura cuatro representa la interacción entre los factores de estudio, siendo el factor A la microalga y la cianobacteria (A1: dunaliella, A2: leptó) y el factor B el método de extracción (B1: CIBPA, B2: LAP); en el gráfico se demuestra que la microalga *Dunaliella salina* tiene mayor contenido de betacarotenos extraídos mediante el método LAP, por lo que se lo consideraría el mejor tratamiento.

4.1.5. Cuantificación del contenido de clorofila a presente en las muestras de *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*) mediante HPLC

Para poder cuantificar el contenido de betacarotenos, se elaboró una curva de calibración con un estándar de betacaroteno a diferentes concentraciones.

Figura 6

Curva de estándar de calibración de clorofila a



El contenido de clorofila a de las muestras de dunaliella (*Dunaliella salina*) y Lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*) extraídos mediante los dos métodos de extracción se detalla en la tabla 14.

Tabla 13

Contenido de clorofila a

Muestra	Método de extracción	Contenido de clorofila a (mg clorofila a/g muestra)
Dunaliella salina	Método CIBPA	0,10
(<i>Dunaliella salina</i>)	Método LAP	0,35
Lepto (<i>Leptolyngbya lagerheimii.</i>)	Método CIBPA	0,10
	Método LAP	1,38

En su investigación de Fajar (2023) trabajó con diferentes condiciones de cultivo de Dunaliella (*Dunaliella salina*) obtuvo valores de 2,351 mg/mL de clorofila a, sin embargo, hay que considerar que las condiciones de las muestras fueron en estado vegetativo. Lee y colaboradores (2024) estudiaron el contenido de clorofila a de la cianobacteria *Leptolyngbya* en diferentes estadios de crecimiento obteniendo 6,85 mg clorofila a/g en el primer trial y en el segundo trial 5,62 mg de clorofila a/ g, mejores resultados que el presente estudio, sin embargo, hay que considerar que en

el presente estudio se trabajó con la muestra en estado vegetativo sin ser sometida a condiciones estrés, lo que puede incidir en las diferencias de los estudios.

Tabla 14

ANOVA del contenido de clorofila a

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Microalga y cianobacteria	0,785408	1	0,785408	114,80	0,0000
B: Método de extracción	1,77101	1	1,77101	258,86	0,0000
AB	0,795675	1	0,795675	116,30	0,0000
Error total	0,0547333	8	0,00684167		
Total (corr.)	3,40682	11			

Según el análisis de varianza (ANOVA) realizado tanto el factor A: microalga y cianobacteria y el factor B: métodos de extracción tienen un efecto significativo sobre el contenido de clorofila a, ya que los valores -p son inferiores a 0,05, lo que indica diferencias significativas en las variables analizadas.

El método de extracción incide significativamente en el contenido de clorofila a extraído de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, cuyos extractos fueron analizados mediante HPLC.

La ecuación del modelo ajustado es

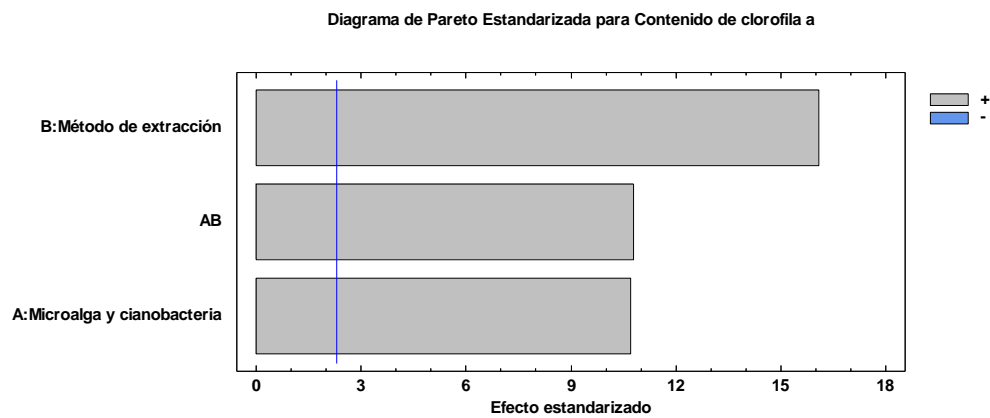
$$\text{Contenido de clorofila a} = 0,4825 + 0,255833*(A) + 0,384167*(B) + 0,2575*(A)*(B)$$

El modelo ajustado indica que la selección de la microalga o cianobacteria es el factor con mayor peso en la variación del contenido de clorofila a, seguido por el método de extracción y la interacción entre ambos. La tendencia positiva de todos los coeficientes refleja que tanto la elección del organismo como la técnica de

extracción contribuyen de complementaria a incrementar la concentración de clorofila a, siendo la optimización conjunta de ambos factores la estrategia más efectiva para maximizar su obtención.

Figura 7

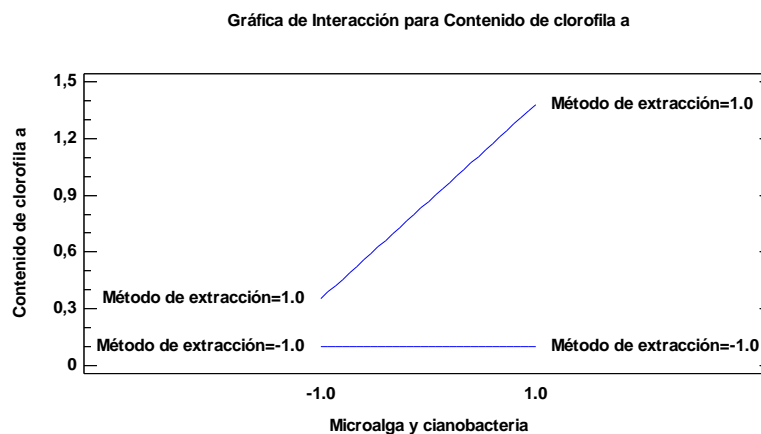
Diagrama del Pareto del contenido de clorofila a



El análisis confirma que el método de extracción es un factor clave en la determinación del contenido de clorofila a. La interacción entre factores también resulta relevante, lo que indica que una adecuada combinación entre la selección de la microalga o cianobacteria y la técnica de extracción puede optimizar la obtención del pigmento.

Figura 8

Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de clorofila a



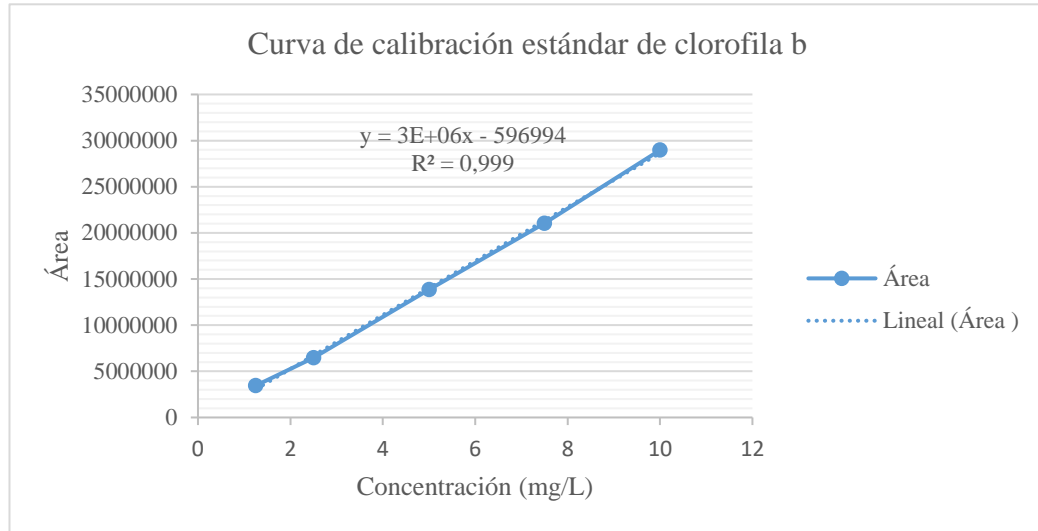
La figura siete representa la interacción entre los factores de estudio, siendo el factor A la microalga y la cianobacteria (A1: dunaliella, A2: lept) y el factor B el método de extracción (B1: CIBPA, B2: LAP); en el gráfico se demuestra que la cianobacteria lept tiene mayor contenido de clorofila a extraída mediante el método LAP, por lo que se lo consideraría el mejor tratamiento.

4.1.6. Cuantificación del contenido de clorofila b presente en las muestras de dunaliella (*Dunaliella salina*) y lept (*Leptolyngbya lagerheimii*) mediante HPLC

Para poder cuantificar el contenido de betacarotenos, se elaboró una curva de calibración con un estándar de clorofila b a diferentes concentraciones.

Figura 9

Curva de estándar de calibración de clorofila b



El contenido de clorofila b de las muestras de *dunaliella* (*Dunaliella salina*) y *Lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) extraídos mediante los dos métodos de extracción se detalla en la tabla 17.

Tabla 15

Contenido de clorofila b

Muestra	Método de extracción	Contenido de clorofila b (mg clorofila b/g muestra)
Dunaliella salina	Método CIBPA	1,01
(<i>Dunaliella salina</i>)	Método LAP	3,51
Lepto (<i>Leptolyngbya</i>	Método CIBPA	ND
<i>lagerheimii</i> .)	Método LAP	ND

En el estudio de Araj-Shirvani & et al (2024) evaluaron la acumulación de clorofila b en sus resultados esta varía entre 2,01 a 2,58 mg/L, estos resultados son similares a los del presente estudio. En cuanto, a la cianobacteria *lepto* (*Leptolyngbya lagerheimii*) no contienen clorofila b como lo mencionan Baracho & Lombardi (2023).

Tabla 16

ANOVA para el contenido de clorofila b

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Microalga y cianobacteria	15,3454	1	15,3454	10345,22	0,0000
B: Método de extracción	4,67501	1	4,67501	3151,69	0,0000
AB	4,67501	1	4,67501	3151,69	0,0000
Error total	0,0118667	8	0,00148333		
Total (corr.)	24,7073	11			

Según el análisis de varianza (ANOVA) realizado tanto el factor A: microalga y cianobacteria y el factor B: métodos de extracción tienen un efecto significativo sobre el contenido de clorofila b, ya que los valores -p son inferiores a 0,05, lo que indica diferencias significativas en las variables analizadas.

El método de extracción incide significativamente en el contenido de clorofila b extraídos de la microalga *Dunaliella salina* y de la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, cuyos extractos fueron analizados mediante HPLC.

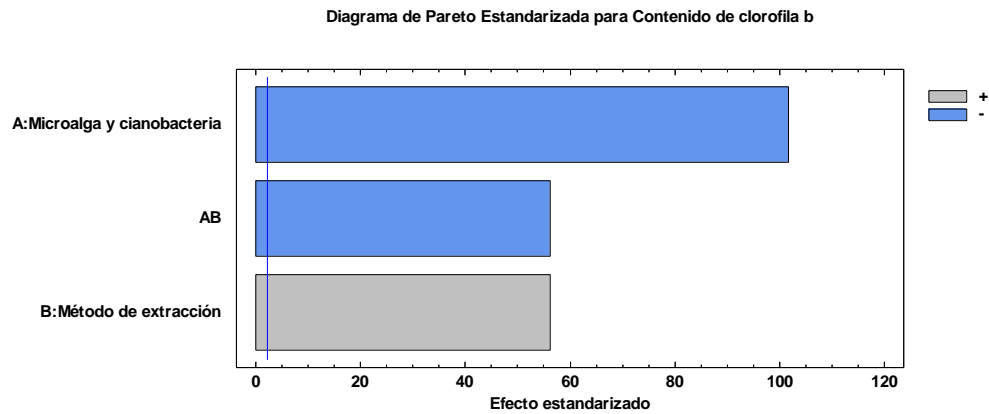
La ecuación del modelo ajustado es

$$\text{Contenido de clorofila b} = 1,13083 - 1,13083*(A) + 0,624167*(B) - 0,624167*(A)*(B)$$

El modelo ajustado indica que la selección de la microalga o cianobacteria es el factor con mayor peso en la variación del contenido de clorofila b, seguido por el método de extracción y la interacción entre ambos. La tendencia negativa de A y AB evidencia que, aunque la técnica de extracción puede mejorar la recuperación del pigmento, la naturaleza biológica del organismo sigue siendo el determinante principal en la concentración final de clorofila b.

Figura 10

Diagrama de Pareto

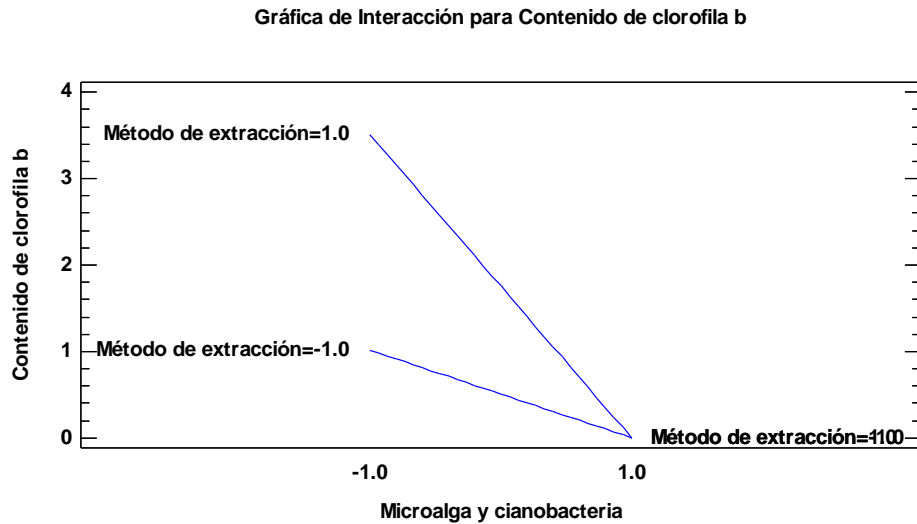


El análisis evidencia que la elección del tipo de organismo (microalga o cianobacteria) constituye la variable clave en la determinación del contenido de clorofila b. En menor medida, el método de extracción y su interacción con el tipo de organismo modulan los resultados, pero no tienen un impacto tan como decisivo el factor A.

Para optimizar la obtención de clorofila b, la selección adecuada del organismo de estudio es importante en comparación con el ajuste del método de extracción. Sin embargo, la significancia relativa de B y AB indica que no deben descartarse, pues un método de extracción apropiado puede contribuir a mejorar los rendimientos en función del tipo de organismo trabajado

Figura 11

Gráfico de interacciones entre los factores de estudio y el contenido de clorofila b



La figura nueve representa la interacción entre los factores de estudio, siendo el factor A la microalga y la cianobacteria (A1: dunaliella, A2: lepto) y el factor B el método de extracción (B1: CIBPA, B2: LAP); en el gráfico se demuestra que la microalga dunaliella tiene mayor contenido de clorofila b extraída mediante el método LAP, por lo que se lo consideraría el mejor tratamiento.

4.1.7. Diseño del producto agroindustrial

4.1.7.1. Caracterización de la necesidad

El consumo de betacarotenos ha ganado relevancia debido a su capacidad para actuar como precursor de la vitamina A y su función antioxidante, esencial para combatir el estrés oxidativo y fortalecer el sistema inmunológico. Sin embargo, muchos consumidores enfrentan dificultades para incorporar suficientes betacarotenos en su dieta diaria, ya sea por el bajo consumo de frutas y verduras ricas en este nutriente o por la preferencia hacia formatos más prácticos y concentrados. Esto ha generado una demanda creciente de suplementos que ofrezcan una alternativa eficiente, de fácil dosificación y absorción, especialmente

en poblaciones con necesidades nutricionales específicas, como deportistas, adultos mayores o personas con dietas restrictivas.

4.1.7.2. Definición del concepto del producto

El desarrollo de un suplemento en polvo de betacarotenos surge como una solución innovadora al combinar alta biodisponibilidad con versatilidad de uso, permitiendo su incorporación en batidos, smoothies o alimentos. A diferencia de las presentaciones tradicionales en cápsulas, este formato mejora la experiencia del usuario al facilitar la personalización del consumo y promover una mejor dispersión del nutriente. Además, al ser un producto natural y libre de aditivos artificiales, responde a la tendencia de consumidores que buscan opciones saludables, sostenibles y adaptables a sus rutinas. Su diseño no solo satisface una necesidad funcional y nutricional, sino que también representa un avance en la suplementación alimentaria al ofrecer una alternativa más accesible y conveniente.

4.1.7.3. Selección materias primas

Dunaliella (Dunaliella salina): actúa como fuente natural y biodisponible de betacarotenos, cumple funciones esenciales en el mantenimiento de la visión, el fortalecimiento del sistema inmunológico y la protección de la piel frente a daños oxidativos.

Magnesio: es un macromineral que participa como cofactor en numerosas reacciones metabólicas, incluyendo la producción de ATP, la contracción muscular y la transmisión del impulso nervioso. También interviene en la regulación del equilibrio electrolítico y en la reducción de la fatiga y el cansancio. La suplementación con magnesio contribuye al mantenimiento de la salud ósea y a la función normal del sistema nervioso (Porri & et al, 2021).

Ácido ascórbico: su función principal es potenciar la estabilidad y biodisponibilidad del betacaroteno, protegiéndolo de la oxidación y facilitando su conversión en vitamina A en el organismo. Además, preserva la integridad del betacaroteno y refuerza el efecto antioxidante del suplemento (Ali & et al, 2024).

Fosfato tricálcico: es una sal inorgánica compuesta por calcio y fósforo, ampliamente utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica debido a su estabilidad química y baja solubilidad en agua, su función principal es actuar como agente antiaglomerante, mejorando la fluidez del polvo y previniendo la formación de grumos durante el almacenamiento (Moussaoui & et al, 2023).

Zinc: es un oligoelemento esencial involucrado en más de 300 reacciones enzimáticas, relacionadas con la síntesis de proteínas, la replicación de ADN y la regulación de la respuesta inmunitaria. Asimismo, desempeña un papel determinante en procesos de cicatrización y en el mantenimiento de la salud de la piel, cabello y uñas. Su adecuada ingesta contribuye a prevenir deficiencias que pueden derivar en alteraciones inmunológicas y dérmicas (Rosas & Covarrubias , 2020).

4.1.7.4. Formulación del producto

Para el suplemento en polvo se consideró presentaciones de sobres monodosis de 2g, considerando que el consumo diario recomendado de betacarotenos es de 15 mg para adultos.

Tabla 17

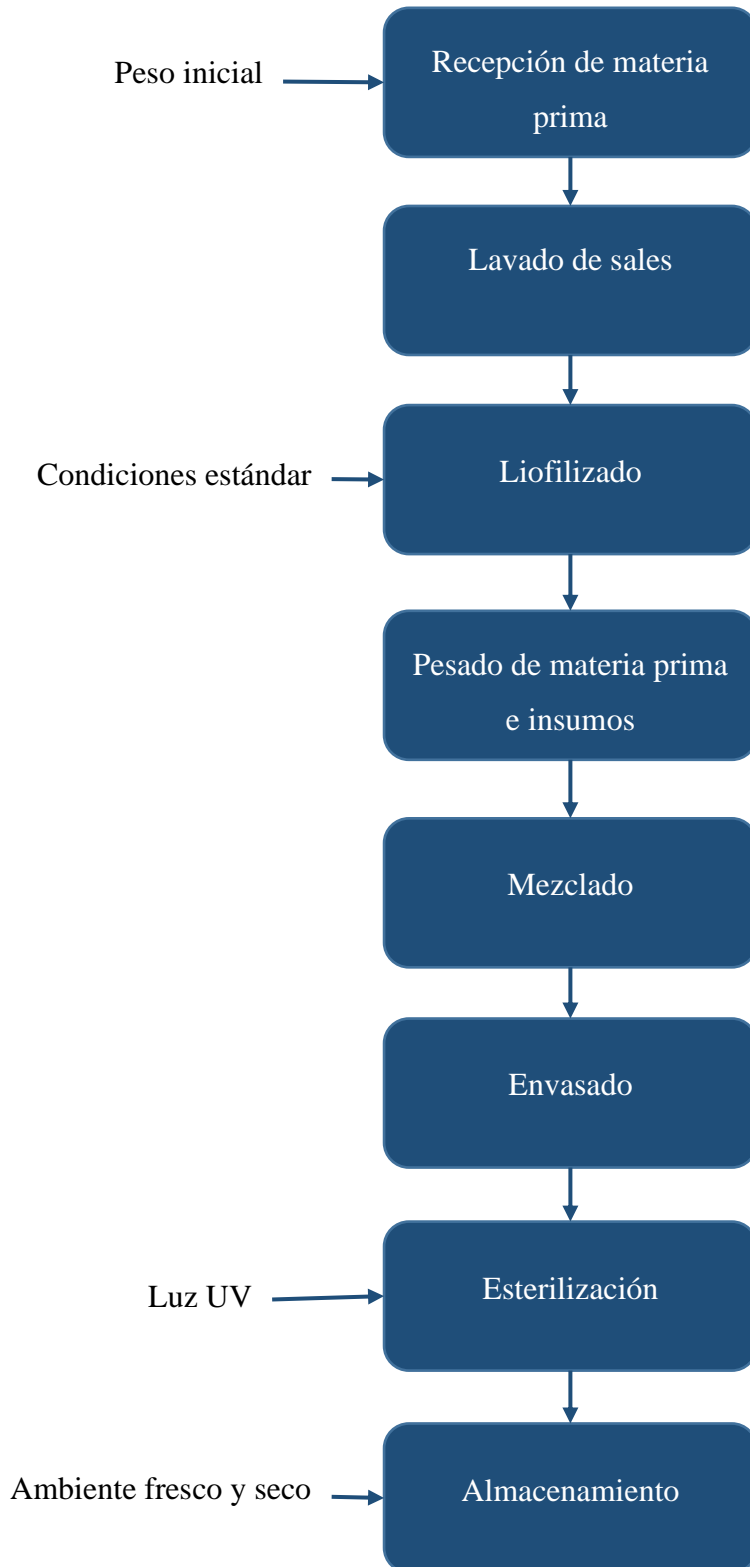
Formulación del suplemento en polvo de betacarotenos.

Ingredientes	Cantidad (%)	Sobre 2 g
Dunaliella (<i>Dunaliella salina</i>)	53,7	1,050 g
Citrato de magnesio	32	625 mg
Ácido ascórbico	10,2	200 mg
Fosfato tricálcico	2,55	50 mg
Zinc	1,6	32 mg

Nota: Elaboración propia

4.1.7.5. Proceso de elaboración

Figura 12 Diagrama de flujo del suplemento en polvo de betacarotenos



Recepción de materia prima: Se receipta la materia prima, se toma el peso inicial.

Lavado de sales: *Dunaliella (Dunaliella salina)* al ser cultivada en ambientes salinos, es importante lavarla para eliminar las sales, que podrían interferir en las características sensoriales finales.

Liofilizado: Una vez lavado, se debe liofilizar la biomasa para poder trabajar con la biomasa seca.

Pesado de materia prima e insumos: Considerando la fórmula se pesan la materia prima y los insumos.

Mezclado: Se mezclan las materias primas e insumos para tener un polvo homogéneo.

Esterilización: Es un proceso muy importante que garantiza la inocuidad del producto, se realiza con luz UV para garantizar la integridad de los compuestos de interés.

Envasado: Se envasa 2g del suplemento en polvo en sobres de aluminio, material que permitirá conservar las características del producto. Se introducen diez unidades en cajas.

Almacenamiento: Se debe almacenar en un ambiente fresco y seco.

4.1.7.6. Identidad de marca

Nombre del producto: Betagreen

Descripción del producto: Suplemento de betacarotenos en polvo.

Tipo de empaque: Sobres monodosis.

Material: Sobres de aluminio, ya que al ser un compuesto fotosensible el material del empaque debe garantizar la integridad del compuesto.

Tamaño y ergonomía: Sobres de 2 g de producto fácil de abrir.

Gráfica del envase:

Figura 13

Empaque del envase



Diferenciación del mercado: Al ser un suplemento en polvo, el consumidor tiene las opciones de consumirlo de diferente manera, al no tener sabor lo hace perfecto para enriquecer comidas dulces o saladas.

Logotipo: Simple que comunica naturalidad.

Tipografía: Legible, coherente con el concepto (orgánica o minimalista).

Tabla nutricional:

Tabla 18

Tabla nutricional del suplemento de betacarotenos

Nutriente	Por porción
Energía	3 kcal
Proteínas	0,12 g
Grasas totales	0 g
Carbohidratos totales	0 g
Azúcares	0 g
Vitamina C	200 mg
Magnesio	100 mg
Calcio	20 mg

Betacaroteno	15 mg
Zinc	10 mg

Ingredientes: Dunaliella (*Dunaliella salina*), magnesio, ácido ascórbico, fosfato tricálcico, zinc.

Modo de uso: Disolver un sobre de 2g en la bebida de su preferencia.

Dosis recomendada: Un sobre diario.

Figura 14

Diseño del sobre monodosis



4.2.COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Con base en los resultados del análisis estadístico realizado, se determinó que los métodos de extracción CIBPA y LAP inciden significativamente en el contenido de betacarotenos, clorofila a y b de la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*). Por lo que, la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) y la cianobacteria leptó (*Leptolyngbya lagerheimii*) no contienen igual cantidad de betacarotenos, clorofila a y b.

CAPÍTULO V

5.1. CONCLUSIONES

- El análisis del contenido de antioxidantes permitió determinar que la microalga *Dunaliella salina* tiene una actividad antioxidante de 130,41 $\mu\text{mol ET/g}$ muestra, mientras que en la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* no se pudo determinar la capacidad antioxidante. En cuanto al contenido de proteína la microalga *Dunaliella salina* contiene 11,25% de proteína superando a la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* que contiene 9,16 % de proteína, por lo que, la actividad antioxidante y el contenido de proteína de la microalga *Dunaliella salina* presenta mayores concentraciones que la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, debido a la ausencia de pared celular rígida en microalga *Dunaliella salina* su alta tasa metabólica en condiciones óptimas y su estrategia de acumulación de proteínas osmorreguladoras explica su mayor contenido proteico en comparación con la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii*, que prioriza otros polímeros estructurales y pigmentos.
- Se compararon los resultados de la cuantificación mediante HPLC utilizando la columna C18 condiciones 25°C de temperatura, 45 bar de presión, 8 μL de volumen de inyección, con un tiempo de corrida de 10 minutos, con los respectivos estándares de betacaroteno, clorofila a y b de la Sigma Aldrich, con el método de extracción LAP validado por (Rowland & et al , 2022) la microalga *Dunaliella salina* obtuvo un mayor contenido de betacarotenos y clorofila b, mientras que la cianobacteria *Leptolyngbya lagerheimii* con el método de extracción LAP obtuvo un mayor contenido de clorofila a, hay que considerar que las cianobacterias no contienen clorofila b.
- Con base a los resultados de los análisis, el mejor método de extracción de betacarotenos, clorofila a y b es el método LAP, los solventes utilizados al ser polares favorecen la extracción, y, al incluir las perlas de acero inoxidable, centrifugado y vortex rompe de manera más eficiente la pared

celular de las muestras permitiendo extraer de manera más efectiva los compuestos de interés.

- Se diseñó un suplemento en polvo de betacarotenos a partir de la microalga *dunaliella* (*Dunaliella salina*), que además contiene magnesio, ácido ascórbico, fosfato tricálcico y zinc que aporta 25-30% del requerimiento diario de magnesio, potencian la absorción de los betacarotenos y potencia su capacidad antioxidante, actúa como antiglomerante y proporciona el requerimiento diario recomendado de zinc respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

- Realizar el trabajo bajo condiciones de oscuridad para prevenir la degradación de los betacarotenos, dado que estos compuestos son fotosensibles como lo mencionan Lisovaya y colaboradores (2025).
- Filtrar cuidadosamente las muestras antes de su análisis en el equipo HPLC, con el fin de evitar interferencias y asegurar resultados precisos.
- Se puede considerar a la cianobacteria letpo (*Leptolyngbya lagerheimii*) para el desarrollo de suplementos proteicos, con base en los resultados del análisis del contenido de proteína esta cianobacteria contiene 9,16% de proteína, que puede ser aprovechado en diferentes industrias como la alimentaria, nutracéutica y el desarrollo de alimentos balanceados para animales.
- Considerar la evaluación de la microalga dunaliella (*Dunaliella salina*) bajo distintas condiciones de estrés, con el propósito de comparar como inciden las condiciones en el cultivo en el contenido de betacarotenos, clorofila a y b, para poder aprovecharlas en diferentes productos e industrias.
- Se encontraron diferentes picos en los cromatogramas, que serían interesantes estudiar con diferentes estándares.
- Para el desarrollo del suplemento se puede considerar ingredientes que aporten mayores beneficios al consumidor.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrego, D., & et al . (2023). The Effect of Beta-Carotene on Cognitive Function: A Systematic Review. *Brain Science*, 13. doi:<https://doi.org/10.3390/brainsci13101468>
- Agostini, A., & et al. (2019). Similarity and Specificity of Chlorophyll b Triplet State in Comparison to Chlorophyll a, as Revealed by EPR/ENDOR and DFT Calculations. *The Journal of Physical Chemistry*, 123(39). doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07912>
- Ahmed, R., & et al . (2017). Bioenergy application of *Dunaliella salina* SA 134 grown at various salinity levels for lipid production. *Scientific Reports*, 7. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07540-x>
- Akram, S., & et al . (2021). β -Carotene: Beyond provitamin A. *A Centum of Valuable Plant Bioactives*. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822923-1.00008-x>
- Alagawany, M., & et al. (2024). La suplementación dietética con la microalga *Dunaliella salina* promueve el crecimiento de las codornices al alterar el perfil lipídico y la inmunidad. *Ciencia Avícola*, 103(5). doi:<https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103591>
- Ali, A., & et al. (2024). Potential of ascorbic acid in human health against different diseases: an updated narrative review. *International Journal of Food Properties*, 27(1). doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2024.2327335>
- Andriopoulos, V., & et al . (2022). Contenido fenólico total, composición de la biomasa y actividad antioxidante de especies de microalgas marinas seleccionadas con potencial como alimento para la acuicultura. *Antioxidants*, 11(7). doi:<https://doi.org/10.3390/antiox11071320>
- Araj-Shirvani, M., & et al . (2024). Biochemical profile of *Dunaliella* isolates from different regions of Iran with a focus on pharmaceutical and nutraceutical potential applications. *Food Science & Nutrition*, 12. doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.4137>

- Araj-Shirvani, M., & et al. (2024). Biochemical profile of *Dunaliella* isolates from different regions. *Food Science & Nutrition*. doi:https://doi.org/10.1002/fsn3.4137
- Assunção, P., & et al. (2012). Molecular taxonomy of *Dunaliella* (Chlorophyceae), with a special focus on *D. salina*: ITS2 sequences revisited with an extensive geographical sampling. *Aquatic Biosystems*, 8(2). doi:https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-2
- Baracho, D., & Lombardi, A. (2023). Study of the growth and biochemical composition of 20 species of cyanobacteria cultured in cylindrical photobioreactors. *Microbial Cell Factories*, 22(36). doi:https://doi.org/10.1186/s12934-023-02035-z
- Barbosa, M., & et al. (2023). La microalga *Dunaliella* y sus aplicaciones: una revisión. *Ficología Aplicada*. doi:https://doi.org/10.1080/26388081.2023.2222318
- Bedogni, G., & et al. (2024). Development of a fast RP-HPLC method for the separation of nifurtimox and its forced degradation products through a design of experiment approach. *Journal of Molecular Liquids*, 399. doi:https://doi.org/10.1016/j.molliq.2024.124293
- Ben-Amotz, A. (2019). Bioactive compounds: glycerol production, carotenoid production, fatty acids production. *The Alga Dunaliella*. doi:ISBN 9780429061639
- Ben-Amotz, A., & Avron, M. (1983). On the Factors Which Determine Massive beta-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol*, 72(3). doi:https://doi.org/10.1104/pp.72.3.593
- Benítez, J., & et al. (2025). Validación de una metodología analítica para la cuantificación de la ciprofloxacina en huevos de gallinas mediante HPLC. *Reportes Científicos De La FACEN*, 14(1). doi:https://doi.org/10.18004/rcfacen.2023.14.1.50%20
- Bernal, L., & et al. (2024). Caracterización Físicoquímica de Harina de Cáscara, Semilla, Pulpa y Germinado de Inga Jinicuil Nativa del Estado de Guerrero.

Revista Ciencia Latina, 8(3).
doi:https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i3.11667

Bertone, E., & et al . (2019). Monitoreo de fluorescencia in situ de cianobacterias: cuantificación en laboratorio de la precisión de la medición específica de la especie. *Harmful alkali*, 87.
doi:<https://doi.org/10.1016/J.HAL.2019.101625>

Bianchini, C., & et al . (2024). Ionic liquid and ultrasound as a fast and innovative combination for improved extraction of *Chlorella sorokiniana*-derived carotenoids. *Algal Research*, 82.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103650>

Bonnefond, H., & et al . (2017). Coupling and uncoupling of triglyceride and beta-carotene production by *Dunaliella salina* under nitrogen limitation and starvation. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 10(25).
doi:<https://doi.org/10.1186/s13068-017-0713-4>

Borovkov, A., & et al . (2019). Morphological and morphometrical features in *Dunaliella salina* (Chlamydomonadales, Dunaliellaceae) during the two-phase cultivation mode. *Ecologica Montenegrina*, 22(1).
doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms12122467>

Borovkov, A., & et al . (2021). Productivity and morphometric parameters of the microalga *Dunaliella salina* IBSS-2 under pilot cultivation in continental mid-latitude climate in spring. *3 Biotech*, 11(438).
doi:<https://doi.org/10.1007/s13205-021-02982-7>

Castellanos-Huerta , I., & et al . (2022). *Dunaliella salina* as a Potential Biofactory for Antigens and Vehicle for Mucosal Application. *Processes*.
doi:<https://doi.org/10.3390/pr10091776>

Chakole, R., & et al . (2021). A Review on HPLC Method Development and Validation. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*, 21(4). Obtenido de <https://ijppr.humanjournals.com/wp-content/uploads/2021/08/6.P.-M.-Deshmukhe-M.-S.-Charde-R.-D.-Chakole.pdf>

- De Andrade, M., & et al . (2019). Supercritical Fluid Extraction of Carotenoids from Vegetable Waste Matrices. *Molecules*, 24(3). doi:<https://doi.org/10.3390/molecules24030466>
- De Souza , G., & et al . (2024). Using wastewater as a cultivation alternative for microalga *Dunaliella salina*: Potentials and challenges. *The Science of the total environment*, 911. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2022.106647>
- Demay, J., & et al . (2019). Productos naturales a partir de cianobacterias: enfoque en actividades beneficiosas. *Marine Drugs*, 17. doi:<https://doi.org/10.3390/md17060320>
- Ezquerro , J., & Chan , J. (2021). Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos. *CienciaUAT*, 5(2). doi:<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1501>
- Fajar, A. (2023). The Effect of Nitrogen and Salinity on The Content of Chlorophyll-a *Dunaliella salina*. *Journal of Aquaculture Development and Environment*, 6(2). doi:<https://doi.org/10.31002/jade.v6i2.7760>
- Farobie, O., & et al . (2023). Extraction of Bio-pigments from the Green Microalgae *Chlorella pyrenoidosa* Under Different Solvent Ratios. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. doi:<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1187/1/012009>
- Fernandes , A., & et al. (2020). HPLC-PDA-MS/MS como estrategia para caracterizar y cuantificar pigmentos naturales de microalgas. *Current Research in Food Science*, 3, 100-112. doi:<https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.03.009>
- Fernandes , A., & et al. (2024). Alternative green solvents associated with ultrasound-assisted extraction: A green chemistry approach for the extraction of carotenoids and chlorophylls from microalgae. *Food chemistry*, 455. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139939>
- Fernández , I. (2012). Aplicaciones de la Técnica Extracción con Fluidos Supercríticos en Química Bioinorgánica. Obtenido de

https://repositorio.ual.es/bitstream/handle/10835/1871/TRABAJO_7028_30.pdf?seq

Guiry , M. (2015). *Leptolyngbya lagerheimii* (Gomont ex Gomont) Anagnostidis & Komárek. Obtenido de <https://www.marinespecies.org/traits/aphia.php?p=taxdetails&id=611368>

Gutiérrez, H., & De la Vara , R. (2012). *Análisis y Diseño de Experimentos* . México : McGraw Hill .

Harvey, P., & Ben , A. (2020). Hacia una biorrefinería sostenible de microalgas *Dunaliella salina* para la producción de 9-cis β -caroteno. *lgal Research-Biomass Biofuels and Bioproducts*, 50. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102002>

Highfield, A., & et al . (2021). Molecular and phylogenetic analysis reveals new diversity of *Dunaliella salina* from hypersaline environments phylogenetic reveals new diversity of *Dunaliella*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 101(1). doi:[10.1017/S0025315420001319](https://doi.org/10.1017/S0025315420001319)

Huang , A., & et al . (2023). The Antioxidant Ability and Extraction Yield of Beta Carotene. *Highlights in Science, Engineering and Technology*. doi:<https://doi.org/10.54097/hset.v58i.10094>

Hussen, A. (2022). High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry*, 6. doi:<https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>

Hynninen, P., & et al . (2025). Electronic structure of the enolate anion of chlorophyll b. *Tetrahedron Letters*, 46(7). doi:<https://doi.org/10.1016/J.TETLET.2004.12.075>

Jo, C., & et al . (2024). Taxonomical, Physiological, and Biochemical Characteristics of *Dunaliella salina* DSTA20 from Hypersaline Environments of Taean Salt Pond, Republic of Korea. *Microorganisms*, 12(12). doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms12122467>

- Kettner, A., & et al . (2022). Leptolyngbya sp. NIVA-CYA 255, a Promising Candidate for Poly(3-hydroxybutyrate) Production under Mixotrophic Deficiency Conditions. *Biomolecules*, 12(4). doi:<https://doi.org/10.3390/biom12040504>
- Khalifa , S., & et al . (2021). Cyanobacteria—From the Oceans to the Potential Biotechnological and Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 19. doi:<https://doi.org/10.3390/md19050241>
- Kim, M., & et al . (2023). Deciphering the β -carotene hyperaccumulation in *Dunaliella* by the comprehensive analysis of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* under high light conditions. *Plant, cell & environment*, 47(1). doi:<https://doi.org/10.1111/pce.14724>
- Kumar , R., & et al . (2018). A comparative analysis of biodiesel production and its properties from *Leptolyngbya* sp. BI-107 and *Chlorella vulgaris* under heat shock stress. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16. doi:<https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2018.09.007>
- Kumar , R., & Rakwal, R. (2022). Aplicaciones de compuestos cianobacterianos en los sectores de energía, salud, productos de valor agregado y agricultura: una perspectiva. *Fisiología de las cianobacterias*. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96106-6.00009-5>
- Kumar, R., & et al . (2024). Elevated temperature extraction of β -carotene from freeze-dried carrot powder into sunflower oil: Extraction kinetics and thermal stability. *Journal of Food Science*, 89(3). doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16964>
- Kumar, S., & et al . (2014). Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>
- Kume, A., & et al . (2018). Why is chlorophyll b only used in light-harvesting systems? *Journal of Plant Research*, 131. doi:<https://doi.org/10.1007/s10265-018-1052-7>

- Kusmayadi, A., & et al . (2021). Microalgae as sustainable food and feed sources for animals and humans - Biotechnological and environmental aspects. *Chemosphere*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129800>
- Lanza, J., & et al . (2016). Comparación entre el método Kjeldahl tradicional y el método Dumas automatizado (N CUBE) para la determinación de proteínas en distintas clases de alimentos. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 28(2). Obtenido de <https://www.redalyc.org/journal/4277/427749623006/html/>
- Lee, W.-K., & et al. (2024). Optimization of Industrial-Scale Cultivation Conditions to Enhance the Nutritional Composition of Nontoxic Cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. KIOST-1. *Applied Science*, 14. doi:<https://doi.org/10.3390/app14010282>
- Li , Y., & et al . (2020). Química, bioquímica y farmacología de productos naturales marinos de *Leptolyngbya*, un género de cianobacterias con dotes químicas. *Marine Drugs*, 18. doi:<https://doi.org/10.3390/md18100508>
- Li, W., & et al . (2021). A Solvent loss study for the application of solvent extraction processes in the pharmaceutical industry. *Chemical Engineering Science*, 250. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ces.2021.117400>
- Lisovaya, E., & et al. (2025). Applications of beta-carotene in food technology. *New Technologies*, 21(1). doi:<https://doi.org/10.47370/2072-0920-2025-21-1-25-40>
- Lopes, G., & et al. (2020). Carotenoids from Cyanobacteria: A Biotechnological Approach for the Topical Treatment of Psoriasis. *Microorganism*, 8(2). doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms8020302>
- Mahanil, K., & et al . (2022). Simple transformation of the filamentous thermophilic cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. KC45. *Algal Research* , 66. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102758>
- Mammone, F., & et al . (2023). Chemo- and enantio-selective reversed-phase HPLC analysis of rosuvastatin using a cellulose-based chiral stationary

- phase in gradient elution mode. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 225. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2023.115239>
- Markwell, J., & et al . (2025). Los Pigmentos Vegetales y la Fotosíntesis. Obtenido de <https://passel2.unl.edu/view/lesson/ae42848963d4/4>
- Maroneze, M., & et al . (2020). Accomplished high resolution metabolomic and molecular studies identify new carotenoid biosynthetic reactions in cyanobacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01306>
- Martins , T., & et al. (2023). Enhancing Health Benefits through Chlorophylls and Chlorophyll-Rich Agro-Food: A Comprehensive Review. *Molecules*, 14(5344). doi:<https://doi.org/10.3390/molecules28145344>
- Mellado, E., & Hornero , D. (2017). Carotenoides en cereales. En A. Meléndez , & et al , *Carotenoides en agroalimentación y salud* (pág. 480). Obtenido de https://digital.csic.es/bitstream/10261/159687/1/Carotenoid_agroaliment_salud_Cap21.pdf
- Minerva, P., & et al. (2025). Phenolic Content, Antioxidant Activity, and Tyrosinase Inhibitor Potential for both Skin and Physical Health. *Retos: nuevas tendencias en educación física, deporte y recreación*. doi:ISSN-e 1988-2041
- Mizoguchi, T., & et al . (2017). Molecular Structures and Functions of Chlorophylls-a Esterified with Geranylgeranyl, Dihydrogeranylgeranyl, and Tetrahydrogeranylgeranyl Groups at the 17-Propionate Residue in a Diatom, *Chaetoceros calcitrans*. *Biochemistry*, 56(28). doi:<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00381>
- Mojaat, M., & et al. (2008). Optimal selection of organic solvents for biocompatible extraction of beta-carotene from *Dunaliella salina*. *Journal of biotechnology*, 133(4). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.11.003>
- Monte , J., & et al . (2019). Biorefinery of *Dunaliella salina*: Sustainable recovery of carotenoids, polar lipids and glycerol. *Bioresource technology*, 297. doi:Bioresource technology

- Morales , E., & et al . (2025). Aislamiento de la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. crecimiento en cultivos discontinuos y análisis de calidad de su biomasa. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 23(1). doi:<https://doi.org/10.18684/rbsaa.v23.n1.2025.2322>
- Morone, J., & et al. (2024). Carotenoids from cyanobacteria modulate iNOS and inhibit the production of inflammatory mediators: Promising agents for the treatment of inflammatory conditions. *Algal Research*, 83. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103729>
- Moussaoui, Y., & et al. (2023). La verdadera naturaleza del fosfato tricálcico utilizado como aditivo alimentario (E341(iii)). *Nanomaterials*, 13(12). doi:<https://doi.org/10.3390/nano13121823>
- Muñoz , S. (2015). Modelo de innovación para el desarrollo y el diseño de nuevos productos agroindustriales. *Revista Gaceta Científica*, 1(2). doi:<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9339575>
- Najdanova, M., & et al . (2018). . A comparison of the 1H-, 13C-, and 15N-NMR data of chlorophyll a and chlorophyll b guided by quantum chemical calculation. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 31(8). doi:<https://doi.org/10.1002/POC.3802>
- Nguyen, P., & et al. (2025). Determination of Carotenoid and Beta-Carotene Content in *Dunaliella* Microalgae Powder. *European Journal of Medical and Health Research*. doi:[https://doi.org/10.59324/ejmhr.2025.3\(1\).05](https://doi.org/10.59324/ejmhr.2025.3(1).05)
- Nowruzi, B., & et al . (2020). Aplicaciones de las cianobacterias en biomedicina. *Manual de ciencia, tecnología y medicina de las algas*. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818305-2.00028-0>
- Núñez , A., & Dos Santos , M. (2020). *Cyanophytas*. doi:ISBN: 978-99967-0-475-8
- Nwachukwu, I., & Aluko, R. (2019). A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chemistry*, 270. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.054>

- Odenthal , K., & et al . (2024). Microalgas y cianobacterias como fuentes naturales de enzimas antioxidantes e inhibidores enzimáticos para el Alzheimer y la diabetes. *Algal Research*, 82. doi:<https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103610>
- Pahlevan, N., & et al . (2020). Seamless retrievals of chlorophyll-a from Sentinel-2 (MSI) and Sentinel-3 (OLCI) in inland and coastal waters: A machine-learning approach. *Remote Sensing of Environment*, 240. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rse.2019.111604>
- Porri , D., & et al. (2021). Effect of magnesium supplementation on women's health and well-being. *NFS Journal*, 23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2021.03.003>
- Pourkarimi, S., & et al . (2020). Factors affecting production of beta-carotene from *Dunaliella salina* microalgae. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 29. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101771>
- Queiroz , M., & et al . (2017). Introductory Chapter: Chlorophyll Molecules and Their Technological Relevance. doi:<https://doi.org/10.5772/67953>.
- Quevedo , K., & et al . (2020). ¿Licopeno y fotoprotección? *Advances in Nutritional Sciences* , 1(1). doi:<https://doi.org/10.47693/ans.v1i1.17>
- Quiroz , I., & Gutiérrez, B. (2024). Aplicación de fluorescencia de clorofila para evaluar desempeño de plantas de hualo en ensayos de terreno. *Ciencia & Investigación Forestal*, 30(1). doi:<https://doi.org/10.52904/0718-4646.2024.603>
- Ramírez , J., & et al . (2024). Diseño de alimentos: de la reflexión al proceso de formulación. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 11(1). doi:<https://doi.org/10.23850/24220582.6221>
- Ranjbarian, F., & et al . (2021). Isocratic HPLC analysis for the simultaneous determination of dNTPs, rNTPs and ADP in biological samples. *Nucleic Acids Research*, 50(3). doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1117>

- Rifqui, M., & et al . (2023). Use of Beta-Carotene Pigment to Improve Food Product Chemical and Sensory Qualities: A Review. *Journal of Functional Food and Nutraceutical*, 4(2). doi:<https://doi.org/10.33555/jffn.v4i2.92>
- Rosas, R., & Covarrubias , A. (2020). El papel del zinc en la salud humana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 58(4). doi:<https://doi.org/10.24875/RMIMSS.M20000073>
- Rowland , S., & et al . (2022). Identification and Quantification of Photosynthetic Pigments in Algae. Laboratory Analytical Procedure (LAP). 4-5. Obtenido de <https://www.nrel.gov/docs/fy23osti/84170.pdf>
- Rozing, G. (2021). Micropillar array columns for advancing nanoflow HPLC. *Microchemical Journal*, 170. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106629>
- Ruíz , A., & et al . (2021). Protocolo para determinación de β-caroteno en microalgas liofilizadas. 48(1). Obtenido de [https://repositorio.imarpe.gob.pe/bitstream/20.500.12958/3536/1/Informe %2048-1%20Articulo3.pdf](https://repositorio.imarpe.gob.pe/bitstream/20.500.12958/3536/1/Informe%2048-1%20Articulo3.pdf)
- Rumpf, J., & et al. (2023). Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 233. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.123470>
- Safdarian, M., & et al . (2020). A fast and simple method for determination of β-carotene in commercial fruit juice by cloud point extraction-cold column trapping combined with UV-Vis spectrophotometry. *Food Chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128481>
- Saini, D., & et al . (2018). Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 120. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>

- Sandybayeva, S., & et al. (2024). Aislamiento, identificación y análisis de pigmentos de nuevas cepas de cianobacterias de fuentes termales. *Plants*. doi:<https://doi.org/10.3390/plants13212951>
- Sarria , R., & et al. (2021). Caracterización de los Aceites Esenciales del Pinus oocarpa por Cromatografía de Gases-Espectrometría De Masas (Gc-Ms) Aceites Esenciales by Gc-Ms. *Revista EIA*, 18(35). doi:<https://doi.org/10.24050/reia.v18i35.1341>
- Schieppati, D., & et al . (2021). Métodos experimentales en ingeniería química: cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99. doi:<https://doi.org/10.1002/CJCE.24050>
- Shahram, H., & Dinani, S. (2019). Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic extraction of β -carotene from orange processing waste. *Journal of Food Process Engineering*. doi:<https://doi.org/10.1111/jfpe.13042>
- Shen , L., & et al . (2022). *Kovacicikia minuta* sp. nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria), una nueva cianobacteria productora de clorofila f de agua dulce. *Revista de Ficología*, 58. doi:<https://doi.org/10.1111/jpy.13248>
- Sportiello, L., & et al . (2024). Potential of microalgae biomass as carotenoids source using natural deep eutectic solvents. *Future Foods*, 10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100418>
- Sui, Y., & et al . (2021). A Comparison of β -Carotene, Phytoene and Amino Acids Production in *Dunaliella salina* DF 15 (CCAP 19/41) and *Dunaliella salina* CCAP 19/30 Using Different Light Wavelengths. *Foods*, 10(11). doi:<https://doi.org/10.3390/foods10112824>
- Székelyhidi, R., & et al . (2023). Optimization and validation of HPLC–DAD method for simultaneous analysis of sweeteners, preservatives, and caffeine in sugar-free beverages. *European Food Research and Technology*, 249. doi:<https://doi.org/10.1007/s00217-023-04328-4>
- Thuan, N., & et al . (2019). Recent Advances in Exploration and Biotechnological Production of Bioactive Compounds in Three Cyanobacterial Genera:

- Nostoc, Lyngbya, and Microcystis. *Frontiers in Chemistry*, 7. doi:<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00604>
- Tome, T., & et al . (2020). Development of a Unified Reversed-Phase HPLC Method for Efficient Determination of EP and USP Process-Related Impurities in Celecoxib Using Analytical Quality by Design Principles. *Molecules*, 25(4). doi:<https://doi.org/10.3390/molecules25040809>
- Tsolcha, O., & et al . (2018). A Leptolyngbya-based microbial consortium for agro-industrial wastewaters treatment and biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 25. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1989-z>
- Tufail, T., & et al . (2024). Beneficios nutricionales del licopeno y el betacaroteno: Una visión general completa. *Food Science & Nutrition*, 12. doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.4502>
- Ulate, R., & et al . (2019). Validación de un método de detección mediante cromatografía líquida (HPLC-DAD) para la determinación de aloína en productos alimenticios elaborados a partir de sábila (Aloe vera). *Revista Uniciencia*, 33(2). doi:<http://dx.doi.org/10.15359/ru.33-2.2>
- Ullah, R., & et al . (2018). Time-temperature dependent variations in beta-carotene contents in carrot using different spectrophotometric techniques. *Laser Physics*, 28. doi:<https://doi.org/10.1088/1555-6611/aaadee>
- Vargas , E., & et al . (2025). Innovación y desarrollo de productos agroindustriales para la promoción del turismo experiencial. *Journal of Economic and Social Science Research*, 5(2). doi:<https://doi.org/10.55813/gaea/jessr/v5/n2/187>
- Vidussi , F., & et al . (1996). Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton. Separation of chlorophyll a from divinyl chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *Journal of Plankton Research* . doi:<https://dx.doi.org/10.1093/plankt/18.12.2377>
- Voitsekhovskaja, O., & Tyutereva, E. (2015). Chlorophyll b in angiosperms: Functions in photosynthesis, signaling and ontogenetic regulation. *Journal of plant physiology*, 189. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.09.013>

- Von Wettstein, D., & et al. (1995). Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant cell*, 7(7).
doi:<https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.1039>
- Wang, L., & et al . (2021). Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 111.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.077>
- Wang, L., & et al . (2023). Biotechnology advances in β -carotene production by microorganisms. *Trends in Food Science and Technology*, 111.
doi:<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.077>
- Wang, Y., & et al . (2024). Application of molecular simulation in mobile phase development of HPLC. *E3S Web of Conferences*, 522(1003).
doi:<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202452201003>
- Wang, Y.-T., & et al. (2021). Chlorophyllides: Preparation, Purification, and Application. *Biomolecules*, 11(8).
doi:<https://doi.org/10.3390/biom11081115>
- Xu, M., & et al . (2019). Identification of Beta-Carotene Degradation Compounds and Their Structural Elucidation by High-Resolution Accurate Mass Spectrometry. *Journal of food science*, 84(12).
doi:<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14909>
- Yalcin , S., & et al . (2020). Determinación de las capacidades antioxidantes totales de los pigmentos de algas en algas marinas mediante la combinación de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con un ensayo de capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC). *Analytical Letters*, 54, 2239-2258. doi:<https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1855439>
- Yang, Z., & et al . (2024). Natural chlorophyll: a review of analysis methods, health benefits, and stabilization strategies. *Critical reviews in food science and nutrition*. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2356259>
- Yazdani, M. (2022). Effects of media and photo bioreactor operating parameters in microalgae *Dunaliella Salina*, increase in beta-carotene content. doi:
<https://doi.org/10.31224/2123>.

- Youssef, D., & et al . (2022). Metabolitos secundarios antiinfecciosos del morfotipo Lyngbya de la cianobacteria marina entre 1979 y 2022. *Marine Drugs*, 20(12). doi:<https://doi.org/10.3390/md20120768> .
- Zapata, J., & et al . (2024). Estandarización y validación de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de niveles sanguíneos de voriconazol. *Revista del Instituto Nacional de Salud*, 44(1). doi:<https://doi.org/10.7705/biomedica.6959>
- Zaruma , M., & et al. (2024). Diseño de procesos de productos en el sector agropecuario ecuatoriano. *Revista Científica Arbitrada de Investigación en Comunicación, Marketing y Empresa REICOMUNICAR*, 7(14). Obtenido de <https://reicomunicar.org/index.php/reicomunicar/article/view/342>
- Zhang, C., & et al. (2020). A chlorophyll derivative-based bio-solar energy conversion and storage device. *Electrochimica Acta*, 347. doi:<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136283>
- Zhao, G.-H., & et al . (2022). A direct and facile simultaneous quantification of non-polar and polar lipids in different species of marine samples using normal-phase HPLC–CAD. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104813>
- Zhi, Z., & et al . (2024). A generalizable methodology for predicting retention time of small molecule pharmaceutical compounds across reversed-phase HPLC columns. *Journal of Chromatography*, 1742. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.465628>


ANEXOS

Anexo 1 Mapa de ubicación de la investigación



Nota: Mapa y coordenadas del Laboratorio de Investigación y Vinculación de la UEB. Tomado de Google Maps 2025.

Anexo 2 Resultados de los análisis

 UNIVERSIDAD VALLE	DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN	LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN <small>Lugarito 8, Km 1 1/2, vía a San Sebastián, Centro Guaranda, Provincia Bolívar, Ecuador.</small>		Código	IR-AA
		INFORME DE RESULTADOS		Versión	1
				Año	2025
				Página	Página 1 de 1

INFORME DE ENSAYOS N° 157

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA					
Solicitante:	María Adalberto Urbani Gavilánez				
Muestra:	Microalga Dunaliella SP y Cianobacteria Leptolyngbya				
Código asignado UEB:	INV 287, INV 288				
Estado de la muestra:	Sólido				
Envase de recepción:	Frasco plástico con 1 g aprox. de contenido de muestra				
Análisis requerido(s):	Actividad antioxidante				
Fecha de recepción:	01 de abril de 2025				
Fecha de análisis:	14 de mayo 2025				
Fecha de informe:	15 de mayo de 2025				
Técnico (s) asignado:	MPQM				
RESULTADOS OBTENIDOS					
Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado
INV 287	Microalga Dunaliella SP. MET.1	Actividad antioxidante	DPPH ((2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).	µmol ET/g muestra	23,11
	Microalga Dunaliella SP. MET.2				130,41
Inv 288	Cianobacteria Leptolyngbya. MET. 1				N.D
	Cianobacteria Leptolyngbya. MET. 2				N.D

Los resultados de los análisis corresponden a 3 determinaciones por muestra.
 Valor No Determinado: N.D



 Ing. Favlan Bayas PhD.
 Director DIVIUEB

VICERRECTORADO DE
INVESTIGACIÓN Y
VINCULACIÓN

LABORATORIOS DE
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN
Lagunas 1, Km 1.10, vía a San Sebastián, Cantón Guaranda,
Provincia Bolívar, Ecuador

INFORME DE RESULTADOS

Código	PPG12-01
Versión	1
Año	2025
Página	Página 1 de 1

INFORME N° 163-2025

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Solicitante	Maria Adalixe Urbano Gavilánez
Muestra	Microalga <i>Dunaliella</i> sp y Cianobacteria <i>Leptolyngbya</i>
Código asignado UEB	INV-287, INV-288
Estado de la muestra	Sólido, fresco
Envase de recepción	Funda ziploc
Análisis requerido(s)	Determinación de proteína total
Fecha de recepción	01/04/2025
Fecha de análisis	19/05/2025
Fecha de informe	21/05/2025
Técnico (s) asignado	MIPV

RESULTADOS OBTENIDOS

Código	Muestra	Parámetros	Unidad	Método	Resultado	Promedio
INV-287	Microalga <i>Dunaliella</i> sp	Proteína Total	%	Dumas	11,56	11,25
					10,94	
					11,25	
INV-288	Cianobacteria <i>Leptolyngbya</i>	Proteína Total	%	Dumas	9,00	9,16
					9,31	
					9,13	

La muestra se lo realizó con tres réplicas.



 Ing. Favian Bayas Morajón, PhD
 Director DIVIUEB

INFORME DE RESULTADOS

INFORME DE ENSAYOS N° 156

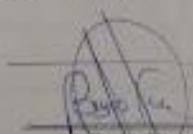
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Solicitante:	María Adalixe Urbano Gavilánez
Muestra:	Microalga Dunaliella SP y Cianobacteria Leptolyngbya
Código asignado UEB:	INV 287, INV 288
Estado de la muestra:	Sólido
Envase de recepción:	Frasco plástico con 1 g aprox. de contenido de muestra
Análisis requerido(s):	Cuantificación de beta - caroteno, clorofila - a y clorofila - b por cromatografía líquida.
Fecha de recepción:	01 de abril de 2025
Fecha de análisis:	06 - 13 de mayo 2025
Fecha de informe:	15 de mayo de 2025
Técnico (s) asignado:	MFGM

RESULTADOS OBTENIDOS

Código de laboratorio	Muestra	Análisis	Método de análisis	Unidad	Resultado			
INV 287	Microalga Dunaliella SP, MET.1	Cuantificación de β -caroteno	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-GAD)	mg β -caroteno / g muestra	4,01			
	Microalga Dunaliella SP, MET.2				10,36			
INV 288	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 1				N.D			
	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 2				0,57			
INV 287	Microalga Dunaliella SP, MET.1				Cuantificación de clorofila-a	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-GAD)	mg clorofila-a / g muestra	0,10
	Microalga Dunaliella SP, MET.2							0,36
INV 288	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 1	0,10						
	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 2	1,38						
INV 287	Microalga Dunaliella SP, MET.1	Cuantificación de clorofila-b	Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-GAD)	mg clorofila-b / g muestra				1,01
	Microalga Dunaliella SP, MET.2							3,49
INV 288	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 1				N.D			
	Cianobacteria Leptolyngbya, MET. 2				N.D			

Los resultados de los análisis corresponden a 3 determinaciones por muestra.
N.D= Valor No Determinado



Ing. Fúzen Bayas PhD.
Director DIVUEB



ANEXOS

Tabla 1. Parámetros de cuantificación de beta-caroteno, clorofila-e y clorofila-b por HPLC-DAD

Equipo:	HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies
Detector:	DAD 400 – 550 nm
Columna:	Kinetex 5 µm EVO C18 100 Å 150 x 4.6 mm
Fase móvil:	80 % Metanol: 20 % Acetato de Etilo
Flujo:	1.0 mL/min
Temperatura columna:	25 °C
Volumen de inyección:	8 µL
Tiempo corrida:	10 min

Tabla 2. Tiempo de retención (min) de cada compuesto analizado por HPLC-DAD

Compuesto	Tiempo de retención (TR min)
Beta - caroteno	4.92
Clorofila - a	2.66
Clorofila - b	2.18

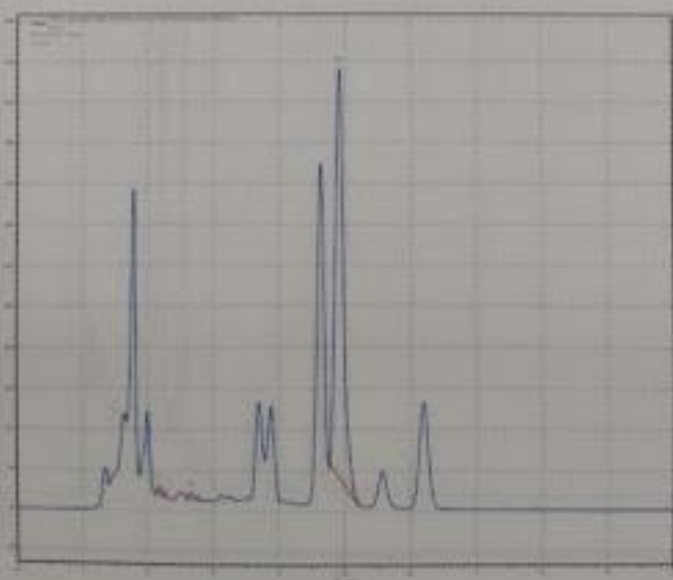


Figura 1. Cromatograma de la muestra de microalga *Dunaliella* SP.M1 (INV 287) obtenido por HPLC-DAD. Clorofila-b (1), clorofila-a (2), beta-caroteno (3)

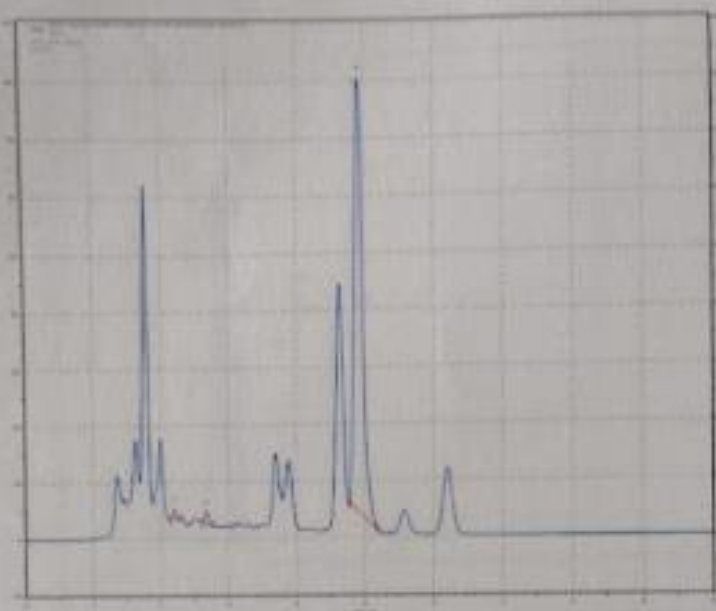


Figura 2. Cromatograma de la muestra de microalga *Dunaliella* SP.M2 (INV 287) obtenido por HPLC-DAD. Clorofila-b (1), clorofila-a (2), beta-caroteno (3)

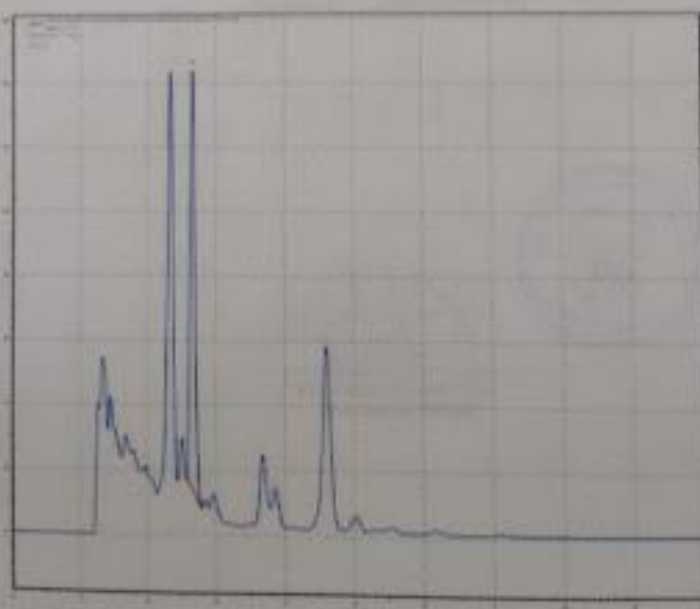


Figura 3. Cromatograma de la muestra de cianobacteria *Leptolyngbya*.M1 (INV 288) obtenida por HPLC-DAD. Clorofila-a (1)

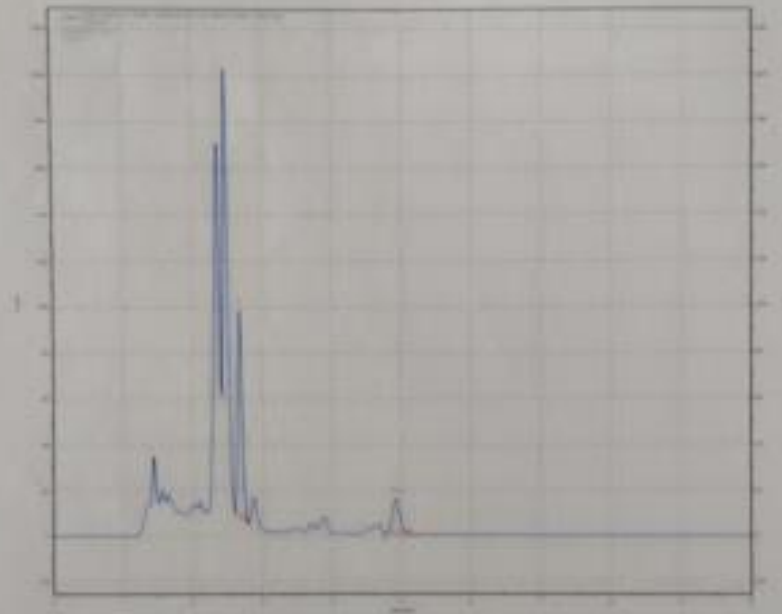
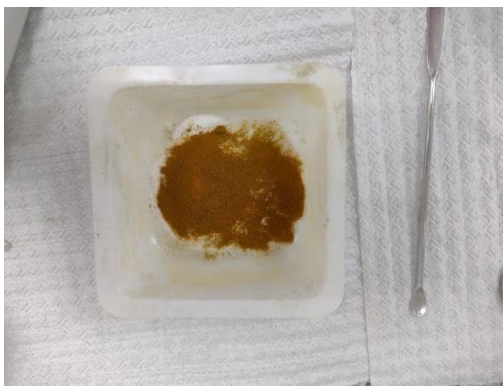


Figura 4. Cromatograma de la muestra de cianobacteria *Leptolyngbya*.M2 (INV 288) obtenida por HPLC-DAD. Clorofila-a (1), beta-caroteno (2).

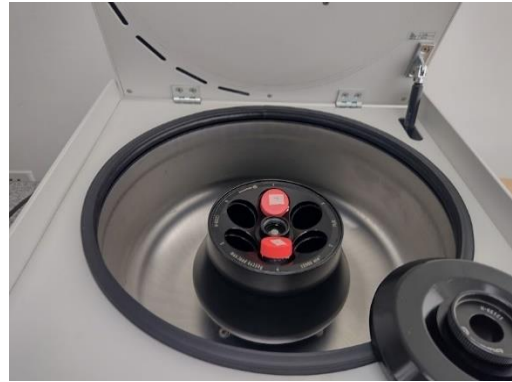
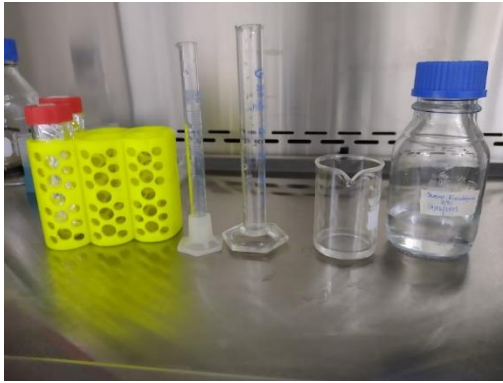

Ing. Favian Bayas PhD
Director DIVIUEB



Anexo 3 Fotografías de muestras



Anexo 4 Lavado de muestras



Preparación de extractos



Equipo de desgasificación de solventes

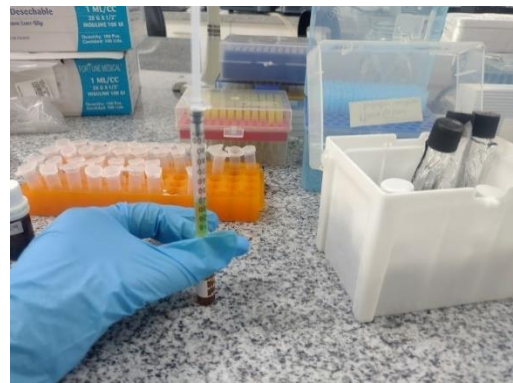
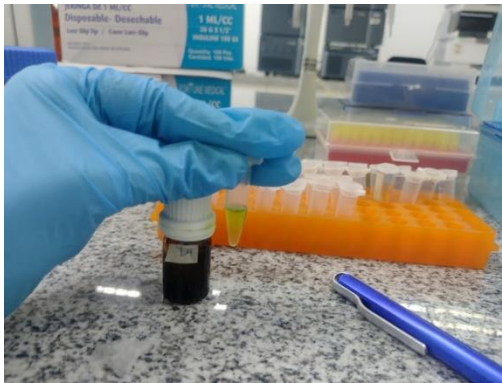


Anexo 5 HPLC

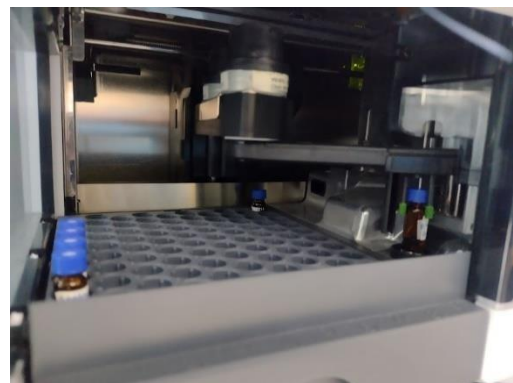
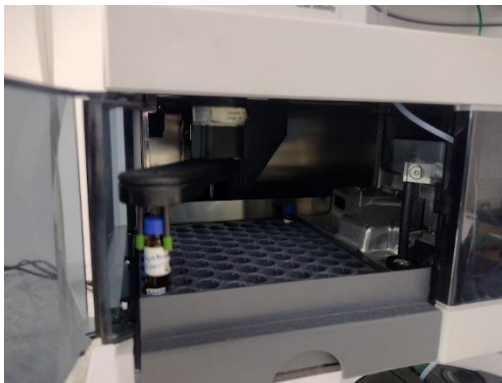
Cambio de columna en el equipo



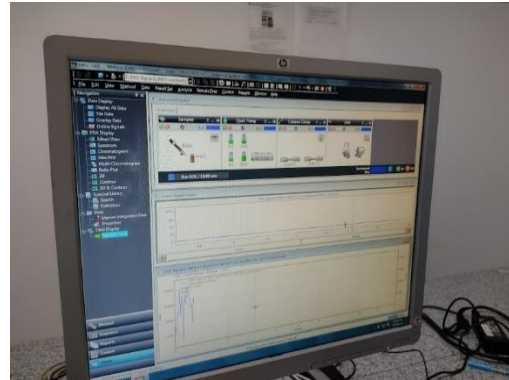
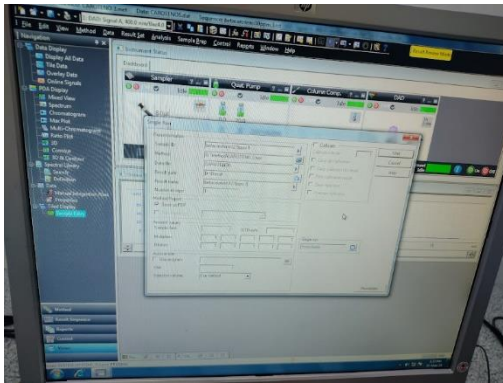
Filtración de extractos



Inyección de las muestras

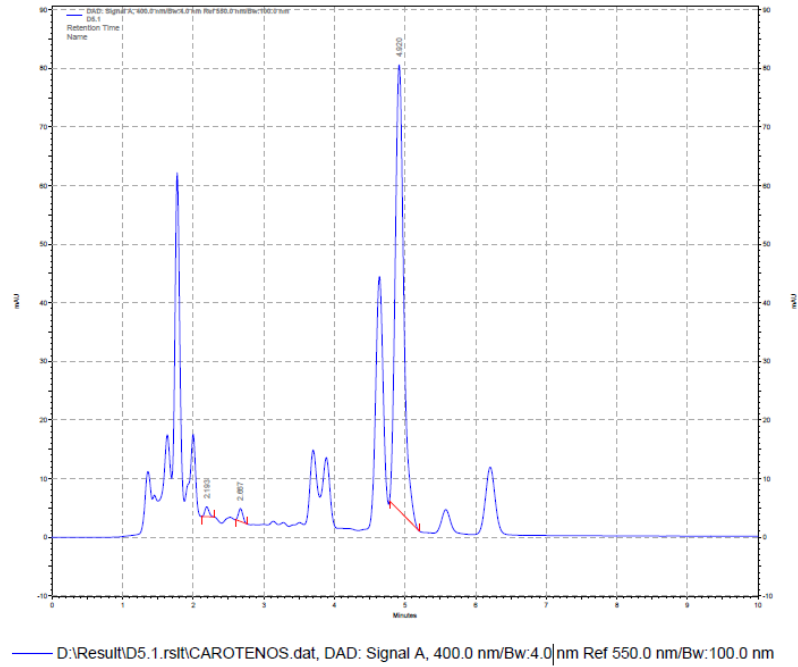


Anexo 6 Software HPLC

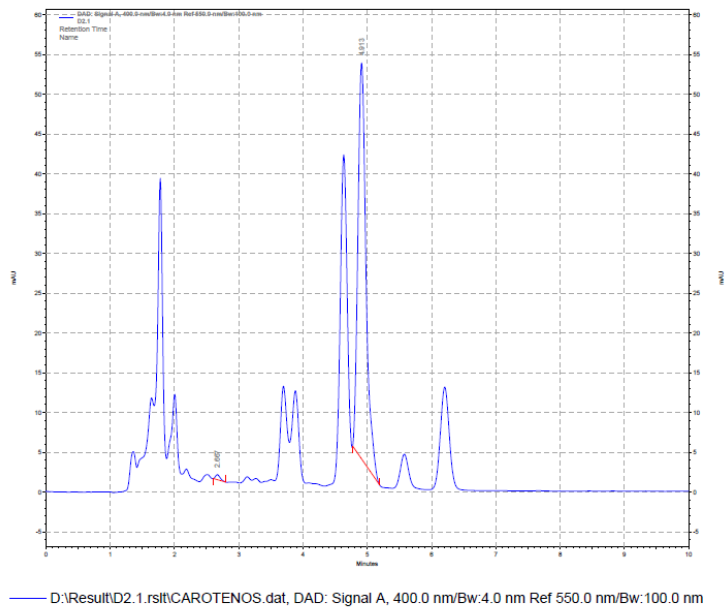


Anexo 7 Cromatogramas dunaliella (*Dunaliella salina*)

Método LAP

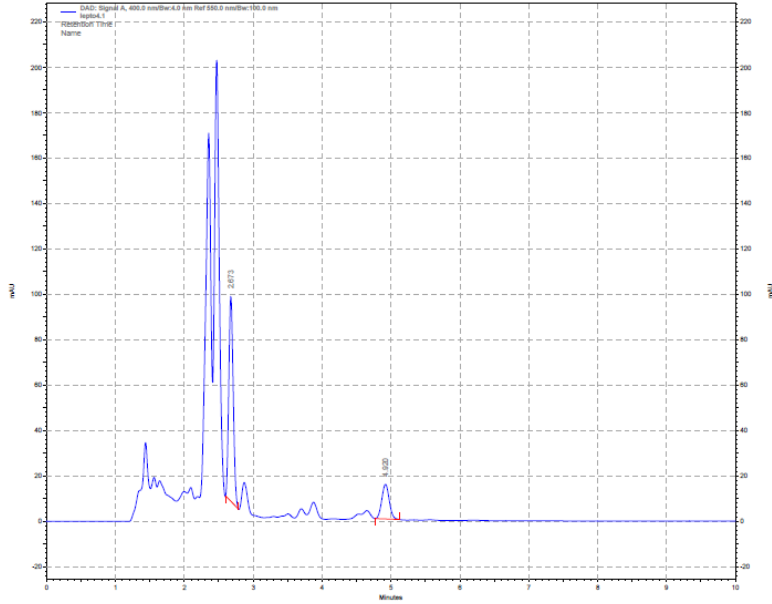


Método CIBPA



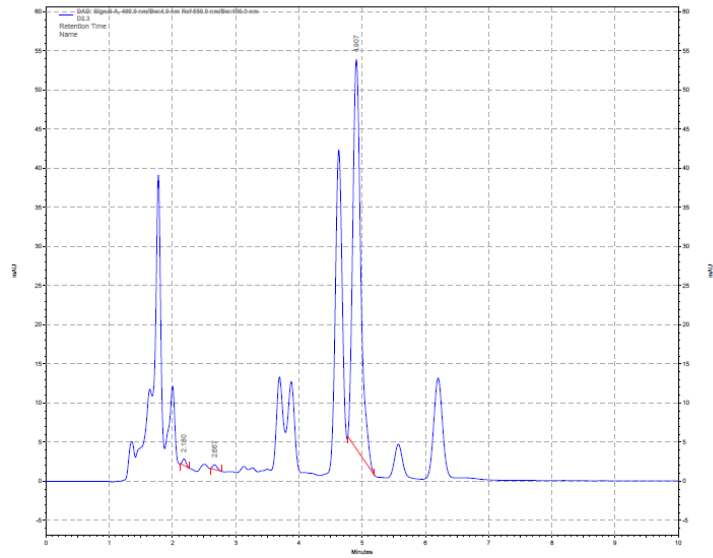
Anexo 8 Cromatograms lepto (*Leptolyngbya lagerheimii*)

Método LAP



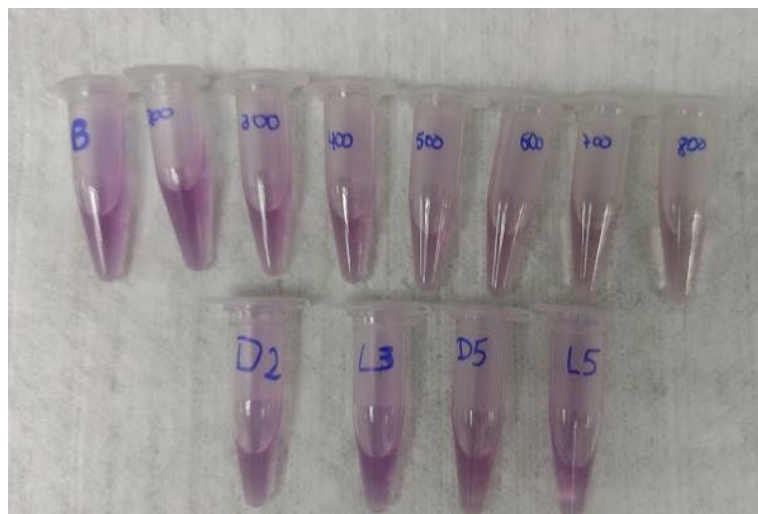
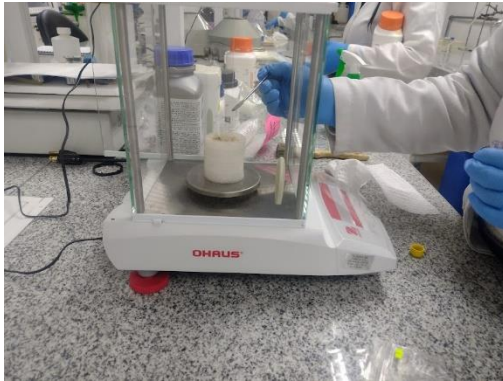
— D:\Result\lepto4.1.rsl\CAROTENOS.dat, DAD: Signal A, 400.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 550.0 nm/Bw:100.0 nm

Método CIBPA

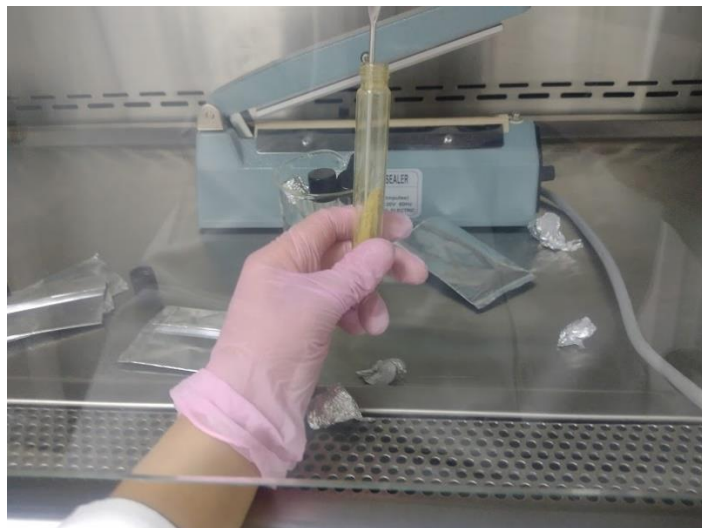
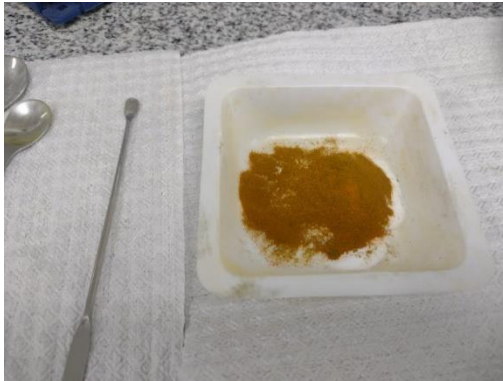


— D:\Result\D2.3.rsl\CAROTENOS.dat, DAD: Signal A, 400.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 550.0 nm/Bw:100.0 nm

Anexo 9 Análisis de capacidad antioxidante



Anexo 10 Diseño del suplemento en polvo de betacaroteno



Anexo 11 Glosario de términos técnicos

Microalgas: Son organismos unicelulares, fotosintéticos y eucariotas que pueden crecer en agua dulce y salada, así como en aguas residuales, son de tamaño microscópico.

Cianobacterias: Las cianobacterias son un grupo de bacterias gramnegativas autótrofas del filo Cyanobacteriota que pueden obtener energía biológica mediante la fotosíntesis oxigénica.

Betacarotenos: Son pigmentos que se encuentran en frutas y verduras, y que el cuerpo transforma en vitamina A. Son antioxidantes que ayudan a proteger las células del daño oxidativo.

Clorofila a: Es un pigmento verde azulado que se encuentra en las plantas, algas y algunos protistas; es esencial para la fotosíntesis, absorbe principalmente la luz en las regiones azul y roja del espectro visible.

Clorofila b: Es un pigmento esencial para la fotosíntesis, absorbe la luz en longitudes de onda distintas a la clorofila a, por lo que tiene un tono verde amarillento.

Métodos de extracción: Proceso en el cual se extrae uno o varios analitos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido.

Cromatografía: Es una técnica de separación de mezclas que permite identificar y cuantificar los componentes individuales de una mezcla compleja.