



UNIVERSIDAD DE CUENCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES FOTO-PERIODOS Y
CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE POLIFENOLES Y
CAROTENOIDES EN ESPECIES CULTIVADAS DE *CHLORELLA* Y
NANNOCHLOROPSIS”**

**TRABAJO DE TITULACION PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE BIOQUÍMICO
FARMACÉUTICO**

**AUTORAS:
DIANA ELIZABETH LUCERO CRIOLLO
C.I. 0104843206
LORENA SIAVICHAY GÓMEZ
C.I. 0105288443**

**DIRECTOR:
DR. FABIÁN LEÓN TAMARIZ PhD
C.I. 0102311610**

CUENCA – ECUADOR

2016



RESUMEN

El presente trabajo de investigación proporciona información de la influencia de diferentes foto-períodos sobre el crecimiento poblacional y la tasa de crecimiento de dos especies de microalgas: *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata* a escala de laboratorio. Además, se presentan las respuestas de estas microalgas frente al incremento y la deficiencia de los macronutrientes nitrógeno y fósforo sobre la síntesis de flavonoides, polifenoles y carotenoides medidos mediante espectrofotometría.

Los resultados revelaron el foto-periodo más beneficioso para cada especie en estudio; resultando así 14/10 horas luz/oscuridad para *Chlorella sp.*, y 10/14 horas luz/oscuridad para *Nannochloropsis oculata*. Además, se pudo observar que el nitrógeno afecta la producción de polifenoles y flavonoides, mientras que el fósforo lo hace sobre la producción de carotenoides en las dos especies de microalgas estudiadas. Esto representa un avance importante en la producción de cultivos fotosintéticos y abre las posibilidades de mejorar la metódica y reducir los costos en la producción total de biomasa.

Palabras claves: microalgas, foto-periodo, macronutrientes, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis oculata*.



ABSTRACT

The present research provides information on the influence of different photo-periods on the growth and the rate of growth of two species of microalgae: *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* cultured at laboratory scale. In addition, the responses of these microalgae to the increasing and deficient of macronutrients nitrogen and phosphorus on synthesis of flavonoids, polyphenols and carotenoids measured by spectrophotometry are presented.

The results revealed the more beneficial photo-period for each species; resulting in 14/10 hours light/dark for *Chlorella sp.*, and 10/14 hours light/dark for *Nannochloropsis oculata*. In addition, it was observed that nitrogen affects the production of polyphenols and flavonoids, while phosphorus does on the production of carotenoids in the two species of microalgae studied. This represents an important advance in photosynthetic culture production and opens the possibilities to improve the methodology and reduce cost in the total of production of biomass.

Key words: microalgae, photo-period, macronutrients, *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis oculata*.



INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 8 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 10 |
| INTRODUCCIÓN | 20 |
| Objetivo general..... | 21 |
| Objetivos específicos | 21 |
| CAPÍTULO 1 | 22 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 22 |
| 1.1. Definición y clasificación de las microalgas..... | 22 |
| 1.2. Importancia biológica..... | 22 |
| 1.3. Composición bioquímica de las microalgas | 23 |
| 1.4. Efecto de estímulos físicos y químicos sobre la composición bioquímica de las microalgas..... | 24 |
| 1.5. Fotosíntesis | 24 |
| 1.6. Dinámica del crecimiento de las microalgas | 26 |
| 1.7. Descripción de las especies de microalgas investigadas..... | 27 |
| 1.8. Cultivo de microalgas | 29 |
| 1.9. Efecto de la limitación y exceso de nutrientes sobre el crecimiento microalgal .. | 33 |
| 1.10. Actividad farmacológica de las microalgas | 33 |
| CAPÍTULO 2 | 35 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 2.1. Introducción..... | 35 |
| 2.2. Diseño experimental para la concentración de metabolitos investigados..... | 35 |
| 2.2.1. Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides, polifenoles y carotenoides en <i>Chlorella sp.</i> | 37 |



| | | |
|----------------------------------|--|-----------|
| 2.2.2. | Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides, polifenoles y carotenoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 38 |
| 2.3. | Tipos de medio de Cultivo: | 40 |
| 2.3.1. | Materiales para la preparación de medios de cultivo WC y F/2..... | 40 |
| 2.3.2. | Procedimiento para la preparación de medios WC y F/2 | 40 |
| 2.3.3. | Materiales para controlar las condiciones de cultivo y estimar la tasa de crecimiento microalgal | 42 |
| 2.3.4. | Procedimiento para el montaje del cultivo..... | 42 |
| 2.3.5. | Procedimiento para estimar la tasa de crecimiento microalgal mediante recuento celular con cámara de Neubauer. | 43 |
| 2.3.6. | Preparación de medios de cultivo con modificación en la concentración de nitrógeno y fósforo | 47 |
| 2.3.7. | Procedimiento para la preparación de medios WC y F/2 con modificación en la concentración de nitrógeno y fósforo | 49 |
| 2.3.8. | Procedimiento para el montaje del cultivo modificado..... | 49 |
| 2.3.9. | Materiales para la extracción de microalgas | 50 |
| 2.3.10. | Procedimiento para la extracción de microalgas..... | 50 |
| 2.4. | Análisis cuantitativo de flavonoides, polifenoles y carotenoides..... | 52 |
| 2.4.1. | Materiales para la cuantificación de flavonoides, polifenoles y carotenoides de <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 52 |
| 2.4.2. | Procedimiento para la cuantificación de flavonoides, polifenoles y carotenoides de <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 53 |
| CAPÍTULO 3 | | 57 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 57 |
| 3.1. | Determinación de la fase estacionaria y foto-periodo ideal para <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 57 |
| 3.1.1. | Resultados del máximo crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> | 57 |
| 3.1.2. | Determinación de la tasa de crecimiento geométrico de <i>Chlorella sp.</i> | 58 |



| | | |
|----------|---|----|
| 3.1.3. | Determinación del foto-periodo ideal para <i>Chlorella sp.</i> | 59 |
| 3.1.4. | Resultados del máximo crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> | 60 |
| 3.1.5. | Determinación de la tasa de crecimiento geométrico en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 60 |
| 3.1.6. | Determinación del foto-periodo ideal para <i>Nannochloropsis oculata</i> | 62 |
| 3.2. | Efecto de la variación de nitrógeno y fósforo en los medios de cultivo sobre la síntesis de flavonoides, polifenoles y carotenoides de <i>Chlorella sp</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 62 |
| 3.2.1. | Análisis cuantitativo de flavonoides en <i>Chlorella sp</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 63 |
| 3.2.1.1. | Curva de calibración de flavonoides en <i>Chlorella sp.</i> | 63 |
| 3.2.1.2. | Curva de calibración de flavonoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 65 |
| 3.2.2. | Análisis cuantitativo de polifenoles en <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 67 |
| 3.2.2.1. | Curva de calibración de polifenoles en <i>Chlorella sp.</i> | 67 |
| 3.2.2.2. | Curva de calibración de polifenoles en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 69 |
| 3.2.3. | Análisis cuantitativo de carotenoides en <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 71 |
| 3.2.3.1. | Cuantificación de carotenoides en <i>Chlorella sp.</i> | 71 |
| 3.2.3.2. | Cuantificación de carotenoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> : | 72 |
| 3.2.4. | Resultados de ANOVA sobre la cuantificación de flavonoides en <i>Chlorella sp.</i> | 72 |
| 3.2.5. | Resultados de ANOVA sobre la cuantificación de polifenoles en <i>Chlorella sp.</i> | 75 |
| 3.2.6. | Resultados de la cuantificación de carotenoides en <i>Chlorella sp.</i> :..... | 78 |
| 3.2.7. | Resultados de la cuantificación de flavonoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 80 |
| 3.2.8. | Resultados de la cuantificación de polifenoles en <i>Nannochloropsis oculata</i> : | 83 |



| | |
|--|-----|
| 3.2.9. Resultados de la cuantificación de carotenoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 85 |
| 3.3. Discusión..... | 88 |
| CAPÍTULO 4 | 91 |
| 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES: | 91 |
| 4.1. CONCLUSIONES:..... | 91 |
| 4.2. RECOMENDACIONES:..... | 92 |
| BIBLIOGRAFÍA: | 93 |
| ANEXOS | 98 |
| ANEXO A: Medios de cultivo para <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 98 |
| ANEXO B: Acondicionamiento y observación de los cultivos de microalgas. | 101 |
| ANEXO C: Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu. | 102 |
| ANEXO D: Recuento celular de <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> en cámara de Neubauer..... | 103 |
| ANEXO E: Determinación de la tasa de crecimiento geométrico para <i>Chlorella sp.</i> y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 105 |
| ANEXO F: Comandos y resultados en Matlab | 107 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Cloroplasto y esquema general de las fases luminosa y oscura de la fotosíntesis, adaptado de (Ruiz, 2013)..... | 25 |
| Figura 1.2: Fases en el crecimiento de los cultivos de microalgas, adaptado de (Cabrera, 2014) | 27 |
| Figura 1.3: Células de <i>Chlorella</i> sp., observadas en la cámara de Neubauer, adaptado de (Jaramillo, 2008) | 28 |
| Figura 1.4: Células de <i>Nannochloropsis oculata</i> observadas en la cámara de Neubauer, adaptado de (Millan, 2016) | 29 |
| Figura 2.1: Factores y niveles del factor considerados para el análisis ANOVA de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Nannochloropsis oculata</i> | 36 |
| Figura 2.2: Muestra madre de las dos cepas en estudio. | 43 |
| Figura 2.3: Proceso de siembra de las microalgas..... | 43 |
| Figura 2.4: Diagrama de una rejilla de la cámara de Neubauer, adaptado de (Bastidas, 2013) | 44 |
| Figura 2.5: Profundidad de la cámara de Neubauer, adaptado de (Bastidas, 2013) | 44 |
| Figura 2.6: Recuento de cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer, adaptado de (Cabrera, 2014) | 45 |
| Figura 2.7: Conteo de un cuadro grande de la cámara de Neubauer, adaptado de (Bastidas, 2013)..... | 45 |
| Figura 2.8: Recuento con alta concentración celular, adaptado de (Bastidas, 2013)..... | 45 |
| Figura 2.9: Ultrasonicador LD (Tiempo 15min. Temperatura: 10°C)..... | 51 |
| Figura 2.10: Concentración de microalgas en el rotavapor. | 51 |
| Figura 3.1: Tasa de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. | 59 |
| Figura 3.2: Foto-periodos correspondientes al octavo día de crecimiento celular de <i>Chlorella</i> sp..... | 60 |
| Figura 3.3: Tasa de crecimiento de <i>Nannochloropsis oculata</i> | 62 |
| Figura 3.4: Foto-periodos correspondientes al séptimo día de crecimiento celular de <i>Nannochloropsis oculata</i> | 62 |
| Figura 3.5: Curva de calibración de flavonoides en <i>Chlorella</i> sp. | 64 |
| Figura 3.6: Curva de calibración de flavonoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 66 |
| Figura 3.7: Curva de Calibración de polifenoles en <i>Chlorella</i> sp. | 68 |
| Figura 3.8: Curva de calibración de polifenoles en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 69 |



| | |
|--|----|
| Figura 3.9: Gráfico de Interacción Chlorella sp. | 74 |
| Figura 3.10: Gráfico de interacción Chlorella sp..... | 76 |
| Figura 3.11: Gráfico de interacción Chlorella sp..... | 79 |
| Figura 3.12: Gráfico de interacción Nannochloropsis oculata..... | 81 |
| Figura 3.13: Gráfico de interacción Nannochloropsis oculata..... | 84 |
| Figura 3.14: Gráfico de interacción Nannochloropsis oculata..... | 87 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 2.1: Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides en <i>Chlorella</i> sp..... | 37 |
| Tabla 2.2: Factores empleados en ANOVA para la determinación de polifenoles en <i>Chlorella</i> sp..... | 37 |
| Tabla 2.3: Factores empleados en ANOVA para la determinación de carotenoides en <i>Chlorella</i> sp..... | 38 |
| Tabla 2.4: Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 38 |
| Tabla 2.5: Factores empleados en ANOVA para la determinación de polifenoles en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 39 |
| Tabla 2.6: Factores empleados en ANOVA para la determinación de carotenoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 39 |
| Tabla 2.7: Materiales empleados en la preparación de medios de cultivo WC y F/2. | 40 |
| Tabla 2.8: Medio WC para <i>Chlorella</i> sp. (ANEXO A)..... | 41 |
| Tabla 2.9: Medio F/2 para <i>Nannochloropsis oculata</i> (ANEXO A) | 41 |
| Tabla 2.10: Materiales para el control de los cultivos y tasa de crecimiento..... | 42 |
| Tabla 2.11: Representación de las concentraciones de nitrógeno y fósforo aplicadas a los medios de cultivo. | 47 |
| Tabla 2.12: Concentración empleada en medio WC. | 48 |
| Tabla 2.13: Concentración empleada en medio F/2. | 49 |
| Tabla 2.14: Frascos preparados para el montaje del cultivo. | 49 |
| Tabla 2.15: Materiales para la extracción de microalgas..... | 50 |
| Tabla 2.16: Materiales para la cuantificación de metabolitos secundarios. | 52 |
| Tabla 2.17: Curva de calibración de polifenoles..... | 53 |
| Tabla 2.18: Preparación de patrones para la curva de calibración de Flavonoides. | 54 |
| Tabla 3.1: Día de mayor obtención de la densidad poblacional de <i>Chlorella</i> sp. | 58 |
| Tabla 3.2: Día de máxima obtención de la densidad poblacional de <i>Nannochloropsis oculata</i> | 60 |
| Tabla 3.3: Grupos formados para el análisis de metabolitos secundarios. | 63 |
| Tabla 3.4: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración... | 63 |
| Tabla 3.5: Concentración de flavonoides en <i>Chlorella</i> sp..... | 65 |
| Tabla 3.6: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración... | 65 |
| Tabla 3.7: Concentración de flavonoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 67 |



| | |
|--|----|
| Tabla 3.8: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración... | 67 |
| Tabla 3.9: Concentración de polifenoles en <i>Chlorella</i> sp..... | 69 |
| Tabla 3.10: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración. | 69 |
| Tabla 3.11: Concentración de polifenoles en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 70 |
| Tabla 3.12: Concentración de carotenoides en <i>Chlorella</i> sp. | 71 |
| Tabla 3.13: Concentración de carotenoides en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 72 |
| Tabla 3.14: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Chlorella</i> sp..... | 72 |
| Tabla 3.15: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Chlorella</i> sp..... | 73 |
| Tabla 3.16: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Chlorella</i> sp..... | 73 |
| Tabla 3.17: Representación de parámetros empleados en el gráfico de interacción. | 73 |
| Tabla 3.18: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Chlorella</i> sp..... | 75 |
| Tabla 3.19: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Chlorella</i> sp..... | 76 |
| Tabla 3.20: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Chlorella</i> sp..... | 76 |
| Tabla 3.21: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Chlorella</i> sp..... | 78 |
| Tabla 3.22: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Chlorella</i> sp..... | 78 |
| Tabla 3.23: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Chlorella</i> sp..... | 78 |
| Tabla 3.24: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 80 |
| Tabla 3.25: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 81 |
| Tabla 3.26: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 81 |
| Tabla 3.27: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 83 |
| Tabla 3.28: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 83 |
| Tabla 3.29: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 84 |
| Tabla 3.30: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 86 |



| | |
|--|-----|
| Tabla 3.31: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 86 |
| Tabla 3.32: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en <i>Nannochloropsis oculata</i> | 86 |
| Tabla 4.25: Análisis de la varianza <i>Nannochloropsis oculata</i> | 108 |



DIANA ELIZABETH LUCERO CRIOLLO, autora del Trabajo de Titulación "ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES FOTO-PERIODOS Y CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE POLIFENOLES Y CAROTENOIDES EN ESPECIES CULTIVADAS DE *CHLORELLA* Y *NANNOCHLOROPSIS*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, noviembre de 2016

DIANA ELIZABETH LUCERO CRIOLLO

C.I: 0104843206



LORENA SIAVICHAY GÓMEZ, autora del Trabajo de Titulación "ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES FOTO-PERIODOS Y CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE POLIFENOLES Y CAROTENOIDES EN ESPECIES CULTIVADAS DE *CHLORELLA* Y *NANNOCHLOROPSIS*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora

Cuenca, noviembre de 2016

LORENA SIAVICHAY GÓMEZ

C.I: 0105288443



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

DIANA ELIZABETH LUCERO CRIOLLO, autora del Trabajo de Titulación "ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES FOTO-PERIODOS Y CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE POLIFENOLES Y CAROTENOIDES EN ESPECIES CULTIVADAS DE *CHLORELLA* Y *NANNOCHLOROPSIS*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, noviembre de 2016

DIANA ELIZABETH LUCERO CRIOLLO

C.I: 0104843206



Universidad de Cuenca
Clausula de propiedad intelectual

LORENA SIAVICHAY GÓMEZ, autora del Trabajo de Titulación "ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE DIFERENTES FOTO-PERIODOS Y CONCENTRACIÓN DE NUTRIENTES SOBRE LA SÍNTESIS DE POLIFENOLES Y CAROTENOIDES EN ESPECIES CULTIVADAS DE *CHLORELLA* Y *NANNOCHLOROPSIS*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, noviembre de 2016

LORENA SIAVICHAY GÓMEZ

C.I: 0105288443



DEDICATORIA.

A Dios, por ser la luz de mi vida, por permitirme alcanzar mis metas y por tantas bendiciones recibidas.

A mis padres, Juan y Elvia, que me apoyaron en todo momento y me enseñaron a luchar y valorar cada esfuerzo que realizaron.

A mis hermanas, Rosa y Fanny por ser la razón para continuar superándome y poder apoyarlas cuando me necesiten.

A mi amado esposo, Luis Miguel, por ser mi compañía, por compartirme sus conocimientos para que esta tesis se realizara con éxito y especialmente por su paciencia y amor brindado.

Diana Elizabeth



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios y a la Virgen de la Merced, por guiarme y permitirme llegar a este momento importante de mi vida.

A mis queridos padres Raúl y Lucía quienes a lo largo de toda mi vida me han apoyado y motivado en mi formación académica brindándome su apoyo incondicional ya que con su amor, sacrificio y tenacidad he podido salir adelante.

A mis hermanas Taty y Sandy por su apoyo, cariño y sus palabras de aliento cuando las he necesitado.

A mi familia, primos y tíos por llenarme de alegría siempre y por impulsarme a seguir adelante.

Dedicar también a mis abuelitos que desde el cielo guían mi camino y lograron transmitirme sus enseñanzas para poder superar cualquier obstáculo de la vida. Esto es por ustedes!

A mí enamorado Freddy por apoyo, su paciencia, amor, comprensión y motivación en todo momento para poder alcanzar esta meta.

A mis amigos, por sus palabras de aliento, su apoyo para salir adelante y por los momentos compartidos que la vida nos regala pues más, que amigos son hermanos.

Por último a mis profesores que durante mi carrera universitaria han inculcado sus conocimientos y sabiduría para mi formación académica como profesional.

Lorena



AGRADECIMIENTO

Dejamos constancia del sincero agradecimiento al Dr. Fabián León Tamariz, director de tesis, por su valiosa orientación, apoyo brindado y supervisión continua durante el periodo de desarrollo de esta investigación.

Queremos hacer extensiva nuestra gratitud a todo el equipo humano que forma parte del proyecto VLIR de Plantas Medicinales, por permitirnos usar las instalaciones y equipos, sin los cuales no habría sido posible la ejecución de este proyecto, en especial a la Master Jessica Calle por el apoyo, la confianza depositada en nosotras y el ánimo brindado en este proyecto, así también como al Ing. Vladimiro Tobar por su valiosa ayuda en el análisis estadístico, y a la Dra. Nancy Cuzco por el ánimo y conocimientos infundidos.

Al personal del laboratorio de Sanitaria del departamento de Ingeniería Civil por permitirnos utilizar las instalaciones para la realización de este proyecto.

A todos los profesores de la Facultad por los conocimientos impartidos durante estos años que serán muy valiosos para nuestra vida profesional.

Un agradecimiento a nuestras familias, maestros y amigos por su comprensión, paciencia y el ánimo recibidos. A todos ellos, ¡MUCHAS GRACIAS!

Las autoras



INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos unicelulares, eucariotas y fotosintéticos que producen biomasa orgánica a partir de CO_2 y luz.

Se caracterizan por generar biomasa útil para la obtención de productos de alto valor añadido. Esta biomasa está constituida principalmente por metabolitos primarios como carbohidratos, proteínas, lípidos y metabolitos secundarios tales como polifenoles y carotenoides. Es por ello que se les considera como una fuente de sustancias con actividad biológica explotable en diversos campos, como el farmacéutico. Como ejemplo, se puede citar la presencia de varios metabolitos con actividad antioxidante, entre los cuales destacan: carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico (vitamina C), flavonoides y otros compuestos fenólicos. (Goiris y otros, 2014).

No obstante, el empleo de microalgas presenta grandes desafíos, como el diseño de las instalaciones requeridas para su crecimiento, determinación de condiciones específicas de cultivo óptimo como por ejemplo: foto-periodo (horas de luz y oscuridad), temperatura, pH, concentración de macro y micro nutrientes en el cultivo, entre otras. El crecimiento y la división celular de estos microorganismos son afectados por el foto-periodo por ejemplo, un foto-periodo continuo (horas de luz prolongada) produce crecimientos rápidos, sin embargo, se puede llegar a la inhibición o hasta la muerte celular, mientras que un foto-periodo con luz y oscuridad semejante al solar, mantiene un crecimiento normal y saludable, así la biomasa.

Además de los factores antes mencionados, se requieren macro y micro nutrientes en concentraciones variables destacándose entre ellos el nitrógeno y fósforo, para lograr una síntesis óptima de metabolitos, que variará su cantidad según



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

la cantidad y calidad de biomasa producida a partir de *Nannochloro*
Chlorella sp. Por tal razón, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar el efecto que tienen sobre la producción de biomasa y su co
diferentes períodos de foto-exposición y la cantidad de nutrientes dispon
cultivos de *Nannochloropsis oculata* y *Chlorella sp.*

Objetivos específicos

- Determinar la influencia de diferentes foto-periodos sobre el
productividad de biomasa de las microalgas *Nannochloropsis ocul*
sp.
- Evaluar el efecto de la concentración de nutrientes sobre l
flavonoides, polifenoles y carotenoides en cultivos de *Nannochloro*
Chlorella sp.
- Cuantificar flavonoides, polifenoles y carotenoides de *Nannochloro*
Chlorella sp. mediante espectrofotometría.



CAPÍTULO 1

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Definición y clasificación de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas, capaces de llevar a cabo la fotosíntesis, varían en forma y tamaño, están distribuidas en casi todos los ambientes acuáticos conocidos como por ejemplo: aguas marinas, dulces, salobres, residuales, etc. Se caracterizan por ser eficientes en la fijación de CO_2 y utilización de la luz para generar biomasa orgánica.

Numerosas microalgas tienen la capacidad para crecer de manera autótrofa, heterotrófica o mixotrófica. Cumplen el mismo papel que las plantas en el ecosistema, es decir son los productores primarios. Se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta (Garibay, 2013) (Ruiz, 2013).

De acuerdo con la clasificación sistemática, las cientos de miles de especies de microalgas se agrupan en nueve divisiones entre las más importantes destacan: *Chlorophyta* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas pardas), *Pyrrophyceae* (dinoflageladas), *Rhodophyta* (algas rojas) y *Chrysophyceae* (algas verde-amarillas) (Ruiz, 2013).

1.2. Importancia biológica

Respecto a su importancia biológica, las microalgas constituyen un recurso natural de gran importancia. En la naturaleza, son organismos fotosintetizadores, fabrican suministros para otros organismos transformando la materia inorgánica en orgánica, que es aprovechada por organismos como son hongos y animales. Además en este proceso se libera oxígeno que es utilizado por organismos aerobios.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

más destacadas. Se emplean por lo tanto a nivel agrícola, industrial, principalmente alimenticio ya que constituyen una valiosa fuente de vitaminas y minerales, entre ellos calcio, potasio, magnesio, zinc, hierro y otros, 2011).

Las microalgas, tienen importantes aplicaciones industriales, pues se constituyen en una fuente de vitaminas, de ácidos grasos y de pigmentos naturales, principalmente el caroteno que tienen un amplio rango de aplicaciones como por ejemplo en cosméticos, como colorante y como fuente de provitamina A. Especies como *Chlorella spp.*, *Dunaliella spp.* y *Scenedesmus spp.* tienen importancia por su contenido de lípidos, proteínas, clorofila, carotenoides, vitaminas, minerales y pigmentos. Se utilizan como alimentos densos en nutrientes y fuentes de productos naturales (AST Ingeniería S.L., 2013) (Rolim, 2013).

1.3. Composición bioquímica de las microalgas

La biomasa de las microalgas está constituida generalmente por: proteínas, carbohidratos (20-30%), lípidos (10-30%) y cenizas (5-10%) (García, y otros, 2010). Los porcentajes varían en función de las especies y las condiciones de cultivo.

Las microalgas sintetizan ácidos grasos como precursores para la síntesis de lípidos, los cuales se dividen en lípidos polares (glicolípidos y fosfolípidos) y lípidos neutrales (triglicéridos, diglicéridos, hidrocarburos, alquenonas, esteroides y otros). La mayoría de los lípidos microalgales son lípidos polares, que son componentes de las membranas; y los triglicéridos que son una reserva de ácidos grasos para el crecimiento celular, energía metabólica, mantenimiento de la membrana, síntesis de proteínas y una variedad de funciones fisiológicas (Quezada y Olgún, 2010). Cabe destacar que los ácidos grasos esenciales también suministran pigmentos como carotenoides que acentúan la coloración en organismos que los ingieren. Estos pigmentos



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

Entre los compuestos antioxidantes de las microalgas se encuentran: los antioxidantes apolares, como los derivados clorofílicos (clorofila A), carotenoides y los compuestos antioxidantes polares que son compuestos como los flavonoides y ácidos fenólicos y cinámicos, entre los principales metabolitos, por sus estructuras químicas son capaces de donar electrones a metales pro-oxidantes, inhibir reacciones de oxidación, entre otros (Batisson et al., 2009).

1.4. Efecto de estímulos físicos y químicos sobre la composición bioquímica de las microalgas

Las microalgas están ampliamente distribuidas en la biósfera, por lo que están expuestas a condiciones ambientales extremas; es por ello que muchas de ellas son capaces de modificar su ruta metabólica lipídica desviando su metabolismo hacia la síntesis de sustancias de reserva como son los lípidos.

Cuando las microalgas se someten a condiciones de estrés impuestas por estímulos químicos y físicos, solos o en combinación, ocurre síntesis y acumulación de grandes cantidades de triglicéridos, acompañada por considerables alteraciones en la estructura de los lípidos y ácidos grasos. Los principales estímulos químicos son la deficiencia de nutrientes (nitrógeno, fósforo, azufre y silicio), la salinidad y el pH del medio. Los estímulos físicos son la temperatura y la intensidad luminosa. Generalmente, la deficiencia de nitrógeno respecto a los nutrientes, es el factor que induce la síntesis de lípidos en el metabolismo de los lípidos (Quezada y Olgún, 2010).

1.5. Fotosíntesis

- **Definición**

La fotosíntesis es un proceso metabólico que tiene lugar en orgánulos

- **Estructura de los cloroplastos**

Los cloroplastos están constituidos por una membrana tilacoidal de naturaleza lipídica y diferentes pigmentos accesorios captadores de luz; entre ellos destacan la clorofila *a* y *b* y la fucoxantina. Además, en la membrana tilacoidal de las microalgas se encuentran dos complejos fotoquímicos denominados fotosistema I (PSI) y fotosistema II (PSII) que tienen lugar las reacciones iniciales de almacenamiento de energía y de síntesis de proteínas: el complejo citocromo *b6/f* y la ATP sintasa (Pérez & Carril, 2009).

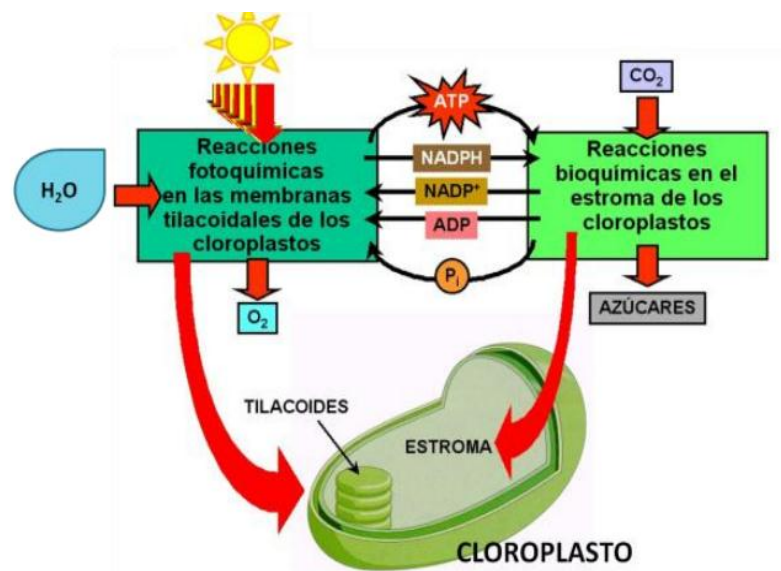


Figura 1.1: Cloroplasto y esquema general de las fases luminosa y oscura de la fotosíntesis (Ruiz, 2013)

- **Proceso de la fotosíntesis**

Para que se dé el proceso de la fotosíntesis, el primer paso es la captación de luz, que es realizado por los cloroplastos de las microalgas (Figura 1.1).

Los pigmentos accesorios de la membrana tilacoidal de los cloroplastos



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

- El complejo citocromo B6F recibe electrones del PSII y los cede a la ferredoxina (Fd) y una flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNR) que transporta protones al lumen desde el estroma.
- El PSI reduce el NADP^+ a NADPH en el estroma gracias a la ferredoxina (Fd) y una flavoproteína ferredoxina-NADP reductasa (FNR).
- La ATP sintasa produce ATP en el estroma a medida que los protones fluyen a su través desde el lumen hacia el estroma (Pérez & Carril, 2009).

De esta forma se convierte la energía luminosa en energía química estable. El trifosfato (ATP) es la primera molécula en la cual dicha energía es almacenada, dichas moléculas de ATP se utilizan para sintetizar otras moléculas orgánicas más estables (Ruiz, 2013).

1.6. Dinámica del crecimiento de las microalgas

Durante el crecimiento microalgal, se puede apreciar cinco fases (Figura 1.2).

- **Fase de retraso o inducción (1)**

En esta fase se produce un ligero aumento en la densidad celular, esto se debe a la adaptación de las microalgas al medio de cultivo. En esta fase las microalgas aumentan su metabolismo principalmente aumentando los niveles de enzimas.

- **Fase exponencial (2)**

Durante la segunda fase, se observa un aumento acelerado de la densidad celular en función del tiempo. No obstante, esta fase de crecimiento, depende principalmente de la especie de microalga, la intensidad de la luz incidente y de la temperatura.

- **Fase de la tasa de disminución del crecimiento (3)**



- **Fase estacionaria (4)**

En la cuarta fase, el número de células se mantiene constante por cierto tiempo debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta el cultivo.

- **Fase de muerte o fase de “accidente” (5)**

Durante la fase final, se deteriora la calidad del agua y los nutrientes, la densidad celular disminuye rápidamente y el cultivo colapsa eventualmente (Esteve, 2013) (Cabrera Cabrera & Pulla Tenemaza, 2014).

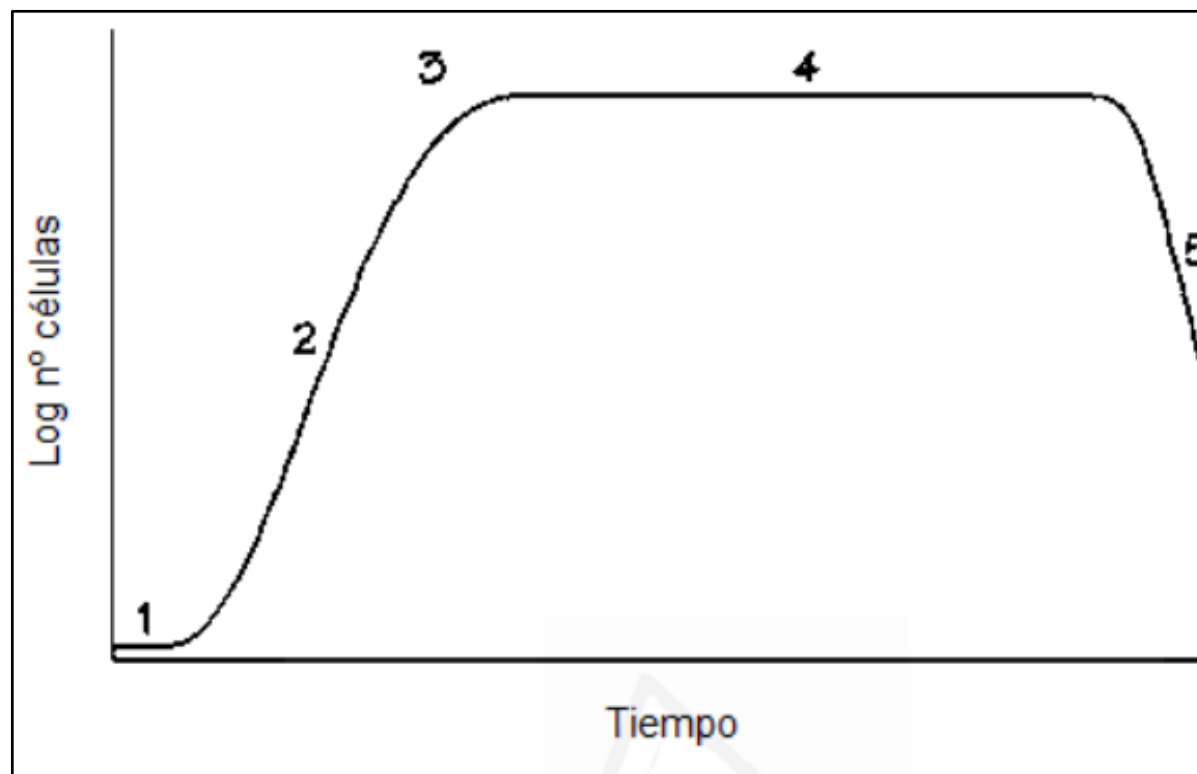


Figura 1.2: Fases en el crecimiento de los cultivos de microalgas, adaptado de (Cabrera Cabrera & Pulla Tenemaza, 2014).

1.7. Descripción de las especies de microalgas investigadas

- ***Chlorella sp.***

El género *Chlorella* pertenece a la división *Chlorophyta* y a la clase de las *Chlorophyceae*.

Los organismos pertenecientes al género *Chlorella sp.* son algas verdes unicelulares.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

El género *Chlorella* se caracteriza por un rápido crecimiento en medios h permite una fácil adaptación a cambios bruscos de pH y temperatura. Ade de desarrollarse en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotró Amores, 2016).

Los cultivos de *Chlorella sp.* contienen diversas vitaminas, lo cual fav nutricional de su biomasa, que contiene carotenoides, tiamina, riboflav cobalamina, biotina, ácido pantoténico, y ácido nicotínico. Además presen significativas de lípidos, proteínas, clorofila, carotenoides, vitaminas pigmentos únicos que se emplean como alimentos densos en nutrientes obtenidos en estudios nutricionales donde se utilizan cultivos de *Chloro suplemento alimenticio, demuestran que estas algas pueden sustituir fuente comunes; aunque su contenido vitamínico depende del genotipo, estad crecimiento, estado nutricional, intensidad de la luz y otros factores desarrollo y metabolismo de las cepas (Quintana, y otros, 2001) (Rolim, 201*

Chlorella es uno de los géneros de mayor importancia comercial y además de forma intensiva con fines de alimentación y producción de metabolitos. L diversos productos a partir de esta especie, le confiere gran interés bi terapéutico (Angulo, y otros, 2012).

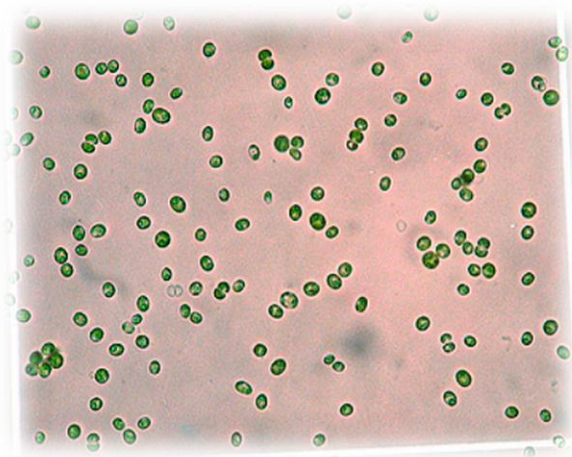


Figura 1.3: Células de *Chlorella sp.* observadas en la cámara de Neubauer, adaptado de



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

especialmente en el crecimiento y desarrollo de larvas de peces, moluscos (Sánchez y otros, 2008).

En su fase de crecimiento presenta una forma elipsoidal, su tamaño oscila entre 2-5 µm. Esta microalga es inmóvil, desprovista de flagelos y posee un cromoplasto parietal de color verde pálido que ocupa gran parte de la célula. El citoplasma contiene una gran acumulación de lípidos. La pared celular es lisa. No tiene zoosporas, resistencia y la reproducción se realiza exclusivamente mediante fisión binomial de células (Catalá Esteve, 2013).

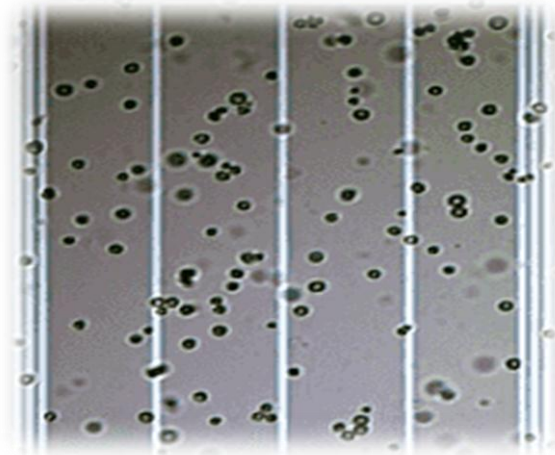


Figura 1.4: Células de *Nannochloropsis oculata* observadas en la cámara de Neubauer, adaptado de (Catalá Esteve, 2016)

1.8. Cultivo de microalgas

A nivel de laboratorio se pueden utilizar diferentes técnicas de cultivo, las cuales intervienen factores como:

- **Luz**

Es uno de los principales parámetros para la fotosíntesis. Con el aumento de la intensidad lumínica, se presenta un incremento de la fotosíntesis, y por ende de la tasa de crecimiento; la cual se amplía hasta alcanzar el punto de saturación. Pasado este punto, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

producción de microalgas, que puede resultar en aumentos de la producción de biomasa y la calidad, dos factores clave para el éxito de cualquier producción industrial (Schulze et al., 2014).

- **Temperatura**

La temperatura óptima de crecimiento de las microalgas varía entre las especies, pero en general está entre 28° y 35°C. La producción algal aumenta proporcionalmente con la temperatura hasta alcanzar la temperatura óptima de cada especie. Por encima de esta temperatura aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global (Pérez & Labbé, 2014).

- **pH**

El pH del cultivo está influenciado por varios factores como la producción de oxígeno por fotosíntesis, respiración, alcalinidad, composición iónica del medio de cultivo, eficiencia de la fotosíntesis y la adición de CO₂ entre los más destacados. Cada especie necesita un rango de pH que permita un crecimiento óptimo, siendo un pH de 8 el más común para las especies dulce acuícolas. Por encima o debajo de éste, se presenta un descenso en la productividad, que no solo afecta el crecimiento algal, sino también la eficiencia de los procesos para remover el nitrógeno en sistemas de tratamientos de aguas (Hernández-Fernández et al., 2014).

- **Aireación**

La aireación es un factor muy importante para la homogenización de los nutrientes y evitar la sedimentación de las microalgas. El movimiento del agua, promovido por la aireación, aumenta significativamente la asimilación de nutrientes para algunas especies. El mecanismo de este fenómeno se basa en que el movimiento del agua disminuye la resistencia a la difusión de los nutrientes (FAO, 2014).



que se desee obtener (Fernandez -Sevilla, 2014). Los requerimientos de los mismos para microalgas son carbono (obtenido del CO_2 o HCO_3^- (generalmente como NO_3^-), fósforo (en forma de ortofosfato), azufre (en forma de sulfato) y otros elementos traza como sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobalto y molibdeno (Manahan, 2007). Estos pueden dividirse en dos grupos: macro y micronutrientes, dependiendo de la función de la cantidad disponible.

Los macronutrientes (incluye compuestos de nitrógeno, fósforo, silicio y azufre) son los componentes fundamentales de macromoléculas y tienen un papel clave en el metabolismo celular. El silicio difiere de los demás macronutrientes por tener un limitado papel en su importancia es estructural (no metabólica) y limitada al grupo de las diatomeas y crisofíceas. Por su parte, los micronutrientes (sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobalto y molibdeno) tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas (Gonzalez Gonzalez, 2010). Dentro de los macronutrientes destacan:

- **Nitrógeno**

El nitrógeno es el nutriente más importante para las microalgas (después del carbono) ya que se incorpora como nitrato (NO_3^-) o como amonio (NH_4^+). Se presenta de diferentes formas en el agua, incluyendo nitrógeno diatómico (N_2), amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), otros óxidos de nitrógeno y nitrógeno en compuestos orgánicos. En ambientes normalmente es bajo en aguas oxigenadas donde las bacterias lo oxidan. En hábitats naturales, las principales fuentes de nitrógeno son nitratos y sulfatos (Roldán & Ramírez, 2008).

En medios de cultivo, el nitrógeno se suele suplir usualmente en la forma de sales como nitratos ya que son estas las principales formas de nitrógeno que utilizan las microalgas. Sin embargo, puede utilizar también nitritos, urea y otras formas de nitrógeno orgánico. El nitrógeno es aceptado en las vías metabólicas de las microalgas.



A nivel bioquímico, la limitación de nitrógeno influye directamente en la síntesis de aminoácidos, lo cual a su vez limita la traslación del ácido ribonucleico mensajero y por lo tanto se reduce la síntesis de proteínas. Un incremento en la disponibilidad de nitrógeno inorgánico generalmente deriva en un incremento de la productividad de productores primarios. Sin embargo, altos niveles de nitrógeno inorgánico que no son asimilados por los sistemas ecológicos pueden causar efectos adversos en organismos menos tolerantes (Gonzalez Gonzalez, 2010).

- **Fósforo**

El fósforo se encuentra en la naturaleza en dos formas principales: orgánica y inorgánica. La liberación del fósforo ocurre aun en las capas superficiales antes de sedimentarse. El fosfato está formado en principio por fósforo orgánico que es rápidamente descompuesto por microorganismos y asimilado por el fitoplancton y plantas acuáticas (Roldán & Ramírez, 2008).

A pesar de que las algas pueden utilizar el nitrógeno en diferentes formas, el fósforo exclusivamente debe ser asimilado en forma de fosfatos y es la concentración de este compuesto la que determina la tasa de crecimiento algal, ya que juega un rol importante en la mayoría de procesos celulares, especialmente los que están relacionados con la generación y transformación de energía metabólica (Gonzalez Gonzalez, 2010).

A nivel bioquímico, la limitación de fósforo influye directamente en el crecimiento celular debido a una limitación de la síntesis de ácidos nucleicos, la cual puede deberse a la replicación del genoma o al nivel de la síntesis de ARN. Esta limitación puede afectar la conversión de energía fotosintética reduciendo la tasa de síntesis de proteínas y el aparato fotosintético, resultando en un efecto negativo en el proceso de fotosíntesis. Por otra parte, al presentarse altas tasas de crecimiento aumenta la demanda de fósforo, particularmente de ARN ribosomal, por lo tanto la deficiencia de fósforo puede ser un factor limitante.



Aunque el contenido en fósforo de las microalgas es menor al 1%, su disponibilidad en el medio de cultivo es una de las mayores limitaciones al crecimiento (Hernández Labbé, 2014).

1.9. Efecto de la limitación y exceso de nutrientes sobre el crecimiento microalgal

Conforme la población celular aumenta, mayor cantidad del nutriente limitado es incorporado en las células, mientras que menor cantidad está disponible para el crecimiento posterior. Por lo tanto, si no hay un reabastecimiento de nutrientes, la concentración declina hasta que eventualmente es muy baja para soportar una gran biomasa. Si hay reproducción continua, la cantidad de recurso contenido por cada organismo disminuye (cuota celular). La reducción de la cuota celular resulta en un decremento en la tasa de crecimiento hasta que alcanza su valor mínimo, a partir del cual no puede haber más crecimiento (fase estacionaria). Por otra parte, la velocidad a la que los organismos consumen los nutrientes depende de la disponibilidad de estos en el medio y de la habilidad misma del organismo para consumirlos. Aún si un nutriente es muy abundante, existen límites en la tasa a la cual un organismo puede consumirlos. Los microorganismos tienen un número limitado de sistemas de transporte de nutrientes a nivel celular, limitando la cantidad de recursos disueltos que pueden ser transportados al interior de la célula por unidad de tiempo. Sin embargo, varios grupos de organismos han desarrollado una interesante adaptación para asegurar la disponibilidad de nutrientes mediante la asimilación excesiva de nutrientes usualmente limitantes durante períodos de crecimiento que se presenten en altas concentraciones (Gonzalez Gonzalez, 2010).

1.10. Actividad farmacológica de las microalgas

La biomasa de las microalgas está constituida por proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, esenciales, pigmentos, minerales y vitaminas. Es por ello que la mayor parte de la biomasa se comercializa como alimentos medicinales en forma de tabletas.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

contenidos en las microalgas (0,01 - 0,3%) pueden ser más altos que los encontrados en la aceituna de oliva, una fuente común de tocoferoles naturales. Contienen además cantidades altas de vitamina C (0,1 - 1,5%), incluso más alto que el contenido de vitamina C que se encuentra en las naranjas (0,3 - 0,5%) (Goiris y otros, 2014).

Dentro de los antioxidantes presentes en microalgas destaca el β -caroteno, un potente captador de radicales libres. Disminuye el riesgo de cataratas y enfermedades degenerativas de la retina relacionada con el envejecimiento (AST Ingeniería y Tecnología). Se puede emplear también como fuente de provitamina A (Santos y otros, 2014).

Los compuestos antioxidantes utilizados como aditivos alimentarios o como ingredientes en productos farmacéuticos, pueden neutralizar el efecto dañino de los radicales libres que se producen en el organismo antes de que causen la oxidación de las biomoléculas. Los antioxidantes podrían ayudar a la prevención de muchas de estas enfermedades asociadas con las especies reactivas del oxígeno (Catalá Esteve, 2013). Partiendo de estos datos, las microalgas se presentan como excelentes candidatos, porque han desarrollado altos niveles de antioxidantes en respuesta a las condiciones oxidativas en que viven, como en condiciones de estrés, las células de ciertas especies de microalgas producen altos niveles de antioxidantes como una respuesta fisiológica para evitar el daño oxidativo. Dichos factores estresantes incluyen intensidad luminosa, temperatura, disponibilidad de nutrientes, entre otros (López y otros, 2013).

Algunas especies de microalgas son utilizadas en la industria de la cosmética para el cuidado de la piel (cremas), que las incluyen por sus propiedades antioxidantes y protectoras de los rayos ultravioletas, tales como *Arthrospira* y *Chlorella* (cremas). También se utilizan en productos refrescantes o regenerantes de la piel, emolientes y antiirritantes. Las microalgas *Chlorella vulgaris* estimulan la síntesis de colágeno, apoyando la regeneración de la piel y la reducción de arrugas. En el caso de *Nannochloropsis oculata*, estudios recientes han demostrado excelentes propiedades para el estiramiento de la piel (Hernández y otros, 2014).



CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Introducción

La Universidad de Cuenca a través del proyecto VLIR de Plantas Medicinales realizó experimentaciones con microalgas con posible interés farmacológico en el área de Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas.

En el presente trabajo se estudió dos cepas de microalgas: *Chlorella* y *Nannochloropsis oculata*; las cuales fueron aisladas y proporcionadas por el proyecto VLIR de plantas medicinales de la Universidad de Cuenca. Las microalgas fueron cultivadas en medios líquidos estándar: WC o de Wright y F/2 de Guillard, previamente esterilizados. Las condiciones de cultivo incluyeron: temperatura de 35 ± 1 °C, luz fluorescentes como fuente de iluminación artificial calibradas a foto-periodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, agitación permanente mediante un compresor de aire. El mantenimiento de los cultivos se realizó en balones de vidrio de fondo redondo con capacidad de 250 mL empleando una determinada cantidad de cultivo.

En este capítulo se desarrollan las diferentes técnicas implementadas y métodos utilizados para la puesta en marcha y experimentación de cultivos de microalgas en el laboratorio; además cada uno de ellos cuenta con una breve descripción de su funcionalidad.

2.2. Diseño experimental para la concentración de metabolitos investigados

Por medio del software MATLAB versión 7.10 se realizó un análisis estadístico (ANOVA) de tres y dos vías para analizar simultáneamente los efectos de las concentraciones de nitrógeno, fósforo, ubicación de los medios de cultivo



- **Factores o variables independientes:** Son las variables que contemplan una serie de poblaciones a comparar, siendo estas poblaciones los niveles de un factor. Se representa como G1, G2, G3 y G31 correspondiendo a los niveles de nitrógeno, fósforo y ubicación de los medios de cultivo por estantes respectivamente. Además se crea la variable group, a la cual se le asignan los valores: 1 y 0 representando a alta concentración y baja concentración respectivamente (+N+P=1; -N-P=0).

El ANOVA que se realizó tanto en los resultados de *Chlorrella sp.* como en *Nannochloropsis oculata*, partió de un nivel de significancia de $\alpha=0,05$ y donde se rechazó la hipótesis nula.

- ✓ **Hipótesis nula (H_0):** No existen diferencias entre los tratamientos.
- ✓ **Hipótesis alternativa (H_1):** Sí existen diferencias entre los tratamientos.

Se denominan tratamientos a las cuatro combinaciones formadas por las diferentes concentraciones de nitrógeno y fósforo (Tabla 3.3).

Si el nivel de significación (valor p) es mayor que α se acepta la hipótesis de independencia entre las variables (no existen efectos diferenciales entre los tratamientos). Sin embargo, si el nivel de significación es menor que α se rechaza la hipótesis de independencia y se acepta la hipótesis alternativa (sí existe una relación de dependencia entre las variables) (Pérez J. L., 2012).

Para aplicar el ANOVA respectivo en ambas especies de microalgas se consideraron los siguientes factores con sus respectivos niveles:





2.2.1. Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides polifenoles y carotenoides en *Chlorella sp.*

| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 98,95 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 101,58 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 100,53 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 108,42 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 54,74 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 53,16 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 54,74 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 50,53 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 41,05 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 40,00 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 43,16 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |
| 38,42 | -N | +P | ESTANTE4 | 2,00 |
| 37,89 | -N | -P | ESTANTE1 | 4,00 |
| 35,79 | -N | -P | ESTANTE2 | 3,00 |
| 37,37 | -N | -P | ESTANTE3 | 2,00 |
| 38,42 | -N | -P | ESTANTE4 | 1,00 |

Tabla 2.1: Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides en C

| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 12,33 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 12,27 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 12,14 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 11,96 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 8,31 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 8,44 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 8,13 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 8,50 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 6,03 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 5,97 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 5,78 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |



| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 17,53 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 16,73 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 17,92 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 16,32 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 7,98 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 8,37 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 7,70 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 7,75 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 10,55 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 11,22 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 11,66 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |
| 12,87 | -N | +P | ESTANTE4 | 2,00 |
| 7,26 | -N | -P | ESTANTE1 | 4,00 |
| 7,67 | -N | -P | ESTANTE2 | 3,00 |
| 6,82 | -N | -P | ESTANTE3 | 2,00 |
| 5,23 | -N | -P | ESTANTE4 | 1,00 |

Tabla 2.3: Factores empleados en ANOVA para la determinación de carotenoides en

2.2.2. Factores empleados en ANOVA para la determinación de flavonoides y carotenoides en *Nannochloropsis oculata*

| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 64,43 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 70,86 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 65,14 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 68,00 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 43,00 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 40,86 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 45,14 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 48,71 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 36,57 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 35,14 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 33,71 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |



| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 10,06 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 8,96 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 9,35 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 9,51 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 6,52 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 6,91 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 6,36 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 7,07 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 6,05 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 6,13 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 5,97 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |
| 5,89 | -N | +P | ESTANTE4 | 2,00 |
| 5,42 | -N | -P | ESTANTE1 | 4,00 |
| 5,26 | -N | -P | ESTANTE2 | 3,00 |
| 5,57 | -N | -P | ESTANTE3 | 2,00 |
| 5,34 | -N | -P | ESTANTE4 | 1,00 |

Tabla 2.5: Factores empleados en ANOVA para la determinación de polifenoles en *Nannoc...*

| Y | G1 | G2 | G3 | G31 |
|---------------|------------|------------|----------|----------|
| CONCENTRACION | COMPUESTO1 | COMPUESTO2 | ESTANTES | COLUMNAS |
| 11,58 | +N | +P | ESTANTE1 | 1,00 |
| 11,15 | +N | +P | ESTANTE2 | 2,00 |
| 10,94 | +N | +P | ESTANTE3 | 3,00 |
| 10,99 | +N | +P | ESTANTE4 | 4,00 |
| 4,09 | +N | -P | ESTANTE1 | 2,00 |
| 3,78 | +N | -P | ESTANTE2 | 1,00 |
| 3,91 | +N | -P | ESTANTE3 | 4,00 |
| 4,09 | +N | -P | ESTANTE4 | 3,00 |
| 8,80 | -N | +P | ESTANTE1 | 3,00 |
| 8,47 | -N | +P | ESTANTE2 | 4,00 |
| 8,93 | -N | +P | ESTANTE3 | 1,00 |



2.3. Tipos de medio de Cultivo:

- **Medio WC o de Wright**

Se utiliza para cultivar criptofitas. El medio WC es ligeramente alcalino (una concentración de 1 mM de nitrato, contiene bicarbonato de sodio, cloruro de silicato y sulfato magnesio y una baja concentración de fosfato (0.05 mM (Guillard, 2001), contiene además elementos traza adicionales tales como aluminio, cobalto, litio, níquel y estaño (Guillard and Lorenzen, 1972).

- **Medio F/2 de Guillar**

Es un medio de enriquecimiento marino, contiene nutrientes principales como nitrógeno, fósforo, silicio. Además, contiene traza de metales y vitaminas, es ampliamente utilizado para el cultivo de diatomeas (Sigma-Aldrich Co. LLC., 2016).

2.3.1. Materiales para la preparación de medios de cultivo WC y F/2

| Materiales | Uso |
|------------------------------------|---------------------|
| Frascos de vidrio de 500ml | Medios de cultivo |
| Autoclave (Tuttnauer) | Esterilización |
| Cámara de flujo laminar (Labconco) | Adición de vitamina |

Tabla 2.7 Materiales empleados en la preparación de medios de cultivo WC y F/2

2.3.2. Procedimiento para la preparación de medios WC y F/2

Los medios de cultivo empleados fueron WC o medio de Wright y F/2 o medio de Guillard para *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata* respectivamente.



- **Medio WC**

| Componente | Volumen empleado |
|---|------------------|
| NaNO ₃ | 500µL |
| Ca Cl ₂ ·2H ₂ O | 500µL |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 500µL |
| NaHCO ₃ | 500µL |
| Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O | 500µL |
| K ₂ HPO ₄ | 500µL |
| Solución traza de metales | 500µL |

Tabla 2.8: Medio WC para *Chlorella sp.* (ANEXO A)

- **Medio F/2**

| Componente | Volumen empleado |
|---|------------------|
| NaNO ₃ | 500 µL |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 500 µL |
| Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O* | 500 µL |
| Solución traza de metales | 500 µL |
| Solución de vitaminas | 500 µL |

Tabla 2.9: Medio F/2 para *Nannochloropsis oculata* (ANEXO A)

1. Se adicionó en frascos de vidrio de 500 mL de capacidad los componentes detallados en las tablas respectivas.
2. Se completó el volumen de cada frasco empleado a 500 mL con agua destilada y se homogenizó.
3. Se esterilizó los medios preparados en la autoclave a 121 °C por 15 minutos.
4. Finalmente dentro de la cámara de flujo laminar, se adicionó el cultivo de *Nannochloropsis oculata*.



2.3.3. Materiales para controlar las condiciones de cultivo y estimar la tasa de crecimiento microalgal

| Materiales | Uso |
|--|--|
| Lámparas fluorescentes (Ts smartlux 54W/840SL Cool White 5000lm Osram) | Fuente de iluminación |
| Cartones de 0,5 cm de espesor forrados de aluminio | Reflejar la luz incidente |
| Compresor de aire (Acq-009, 105 W de poder, output 160 L/min) | Agitación y oxigenación de microalgas |
| Mangueras (Tricoflex) con un diámetro de 0.5 cm | Agitación y oxigenación de microalgas |
| Temporizadores (Hydrofarm 15 amperios/1725 W) | Determinar el fotoperíodo |
| Ventiladores (Sunor 110-120 V 50 -60 Hz/0.26) | Mantener la temperatura adecuada |
| Cinta parafilm (Laboratorio "M") de 4 pulg x 125 pies (10.16 cm x 38.10 m) | Asegurar la permeabilidad del medio de cultivo |
| Balones fondo redondo | Crecimiento de microalgas |
| Pipetas automáticas de 100µl | Toma de muestras |
| Tubos miniCollect | Colocar las muestras |
| Cámara de Neubauer (Boeco) de 0.1mm de profundidad | Recuento celular |
| Cubreobjetos | Recuento celular |
| Microscopio Invertido de 120Voltios (Olympus Modelo CKX41) | Recuento celular |

Tabla 2.10: Materiales para el control de los cultivos y tasa de crecimiento

2.3.4. Procedimiento para el montaje del cultivo

1. En la cámara de flujo laminar y a partir de muestras madre de *Nannochloropsis oculata* (Figura 2.2), se colocó un inóculo de 27 mL en un vidrio fondo redondo de 250 mL de capacidad por cada especie.
2. Se añadió 250 mL del medio de cultivo WC en el caso de *Chlorella sp.* y el medio F/2 el caso de *Nannochloropsis oculata*.

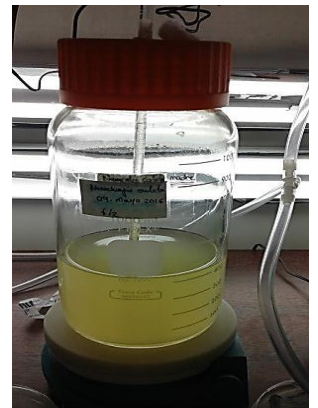


UNIVERSIDAD DE CUENCA.

5. Se colocó los balones con los cultivos respectivos, en el estante acondicionado para los mismos (ANEXO B) en el laboratorio de microalgas del proyecto Universidad de Cuenca.
6. Se encendió la bomba de aire y se puso en marcha los temporizadores. Para evitar la máxima evaporación del medio, se adicionó a cada balón un tapón estéril pasando un día hasta completar el volumen inicial.



a) Muestra madre de *Chlorella* sp.



b) Muestra madre de *Nannochloropsis oculata*

Figura 2.2: Muestra madre de las dos cepas en estudio.

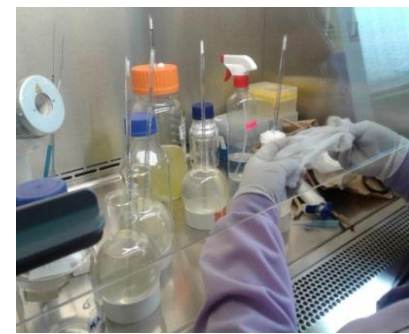


Figura 2.3: Proceso de siembra de las microalgas

2.3.5. Procedimiento para estimar la tasa de crecimiento microalgal mediante el recuento celular con cámara de Neubauer.

El método empleado para contar microalgas implica el uso de un dispositivo



El procedimiento detallado a continuación se realizó por triplicado para la obtención de los resultados.

- **Preparación de la muestra:**

Empleando una pipeta automática de 100 μL , se tomó una muestra del medio de cultivo microalgal correspondiente y se colocó en tubos miniCollect previamente etiquetados.

- **Cámara de Neubauer**

Se trata de una gruesa placa de cristal con forma de portaobjetos, de aproximadamente 30 x 70 mm y 4 mm de grosor, en la cual existen 2 zonas de conteo, una superior y una inferior al eje longitudinal de la cámara. Una retícula completa mide 3 mm x 3 mm. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1 mm de lado cada uno, cada uno de ellos corresponde a un volumen de 0,1 μL . Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños (Bastidas, 2013), como se muestra en la Figura 2.4.

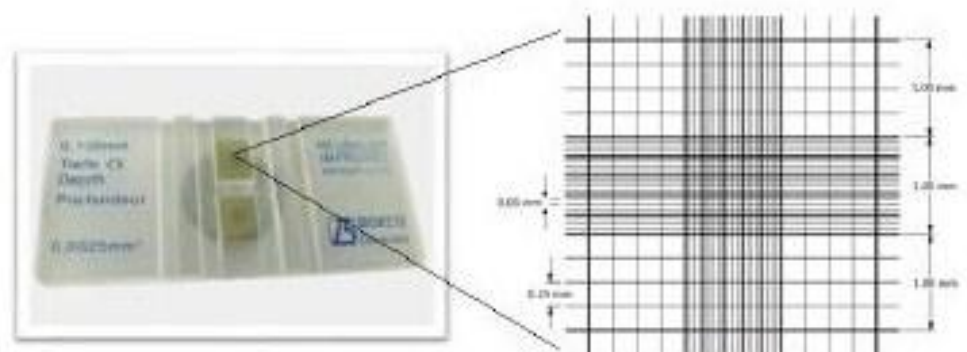


Figura 2.4: Diagrama de una rejilla de la cámara de Neubauer, adaptado de (Bastidas, 2013).

- **Cubreobjetos**

Para observar al microscopio se emplea un cubreobjetos de aproximadamente 22 mm, el cual se coloca de tal forma que cubra la parte central de la cámara.



- **Recuento Celular**

Se colocó el cubreobjetos sobre la superficie en la cámara de Neubauer y con la pipeta automática, se colocó la muestra previamente homogenizada y controlando que no exista aire en el interior de la misma, se ubicó la punta de la pipeta en la cámara de Neubauer y la superficie de la cámara, y se introdujo la muestra controlando que el volumen depositado sea suficiente, de tal manera que llegue hasta los cantos pero sin inundarlos completamente. Se dejó reposar la muestra por dos minutos y se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio y se enfocó con el objetivo de 10X para verificar que las células tengan una distribución homogénea. Luego se enfocó con el objetivo de 40X, hasta lograr una imagen nítida de las células en el microscopio binocular.

De acuerdo a la técnica de recuento celular con cámara de Neubauer (Bastidas (2013)), se cuentan las células presentes en las cuatro cuadrículas como I, II, III y IV (Figura 2.6).

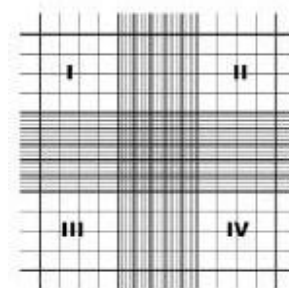


Figura 2.6: Recuento de cuatro cuadros grandes de la cámara de Neubauer, adaptado de Bastidas (2013).

Se realizó el recuento en la primera cuadrícula, para lo cual se consideró la siguiente convención: Si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo de una cuadrícula correspondiente a la primera cuadrícula, deben contabilizarse, pero no se contabilizan si tocan el límite inferior o el límite derecho (Figura 2.7).



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

En el caso de concentraciones celulares altas, para no confundir el recuento se utilizó un orden de conteo en forma de zig-zag. (Figura 2.8). Para determinar el número de células presentes en determinada muestra, se hizo un promedio de los recuentos contabilizados en las cuatro cuadrículas.

- **Cálculo de la concentración**

Se aplicó la siguiente fórmula del cálculo de concentración celular:

$$\text{Concentración (cel/mL)} = \frac{N}{V}$$

Dónde:

N Es el promedio resultante de la suma de las células correspondientes a los cuatro cuadros grandes.

V Es el volumen total de un cuadro grande.

Como el volumen de un cuadro grande resulta de:

$$A = 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} = 1 \text{ mm}^2 \text{ de superficie}$$

$$V = 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm (profundidad)} = 0.1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

Dónde:

A Es el área del cuadrado

V Es el volumen total

Por lo tanto, la concentración celular sería:

$$C \text{ (cel/mL)} = \frac{N}{0,0001} = N \times 10.000 \quad (\text{Bastidas, 2013}).$$



Fórmula para la tasa de crecimiento poblacional:

$$r = \left(\frac{P^{t+n}}{P^t}\right)^{\frac{1}{a}} - 1$$

Dónde:

(Torres)

r Es la tasa de crecimiento anual geométrico.

P^{t+n} Es la población al momento actual.

P^t Población al momento inicial o población base o población inicial.

a Amplitud o distancia en tiempo entre las dos poblaciones de referenc

2.3.6. Preparación de medios de cultivo con modificación en la conce nitrógeno y fósforo

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de las condiciones id
crecimiento de las dos cepas en estudio; se procedió a la preparación de
cultivo en los cuales se modificó únicamente las concentraciones de nitró
de la siguiente manera:

| DENOMINACIÓN | CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO | CONCENTRA FÓSFOR |
|------------------|---|---------------------------------------|
| ALTO (+N) (+P) | Representa el doble de concentración estándar de nitrato. | Representa el dob concentración de |
| BAJO (- N) (- P) | Representa la mitad de concentración estándar de nitrato. | Representa la mit concentración de |

Tabla 2.11: Representación de las concentraciones de nitrógeno y fósforo aplicadas a los m

- ***Chlorella sp.***



La cantidad necesaria para obtener el doble de concentración de nitrato es de 170.02 gramos en 1 litro de agua destilada.

| |
|--|
| N+ |
| Cantidad inicial en 1 litro de agua: $85.01 \text{ g} * \text{L}^{-1}$ |
| Doble concentración de nitrato de sodio: $X = 85 \text{ g} * 2 = 170.02$ |

Para preparar una solución de 10 mL de nitrato de sodio (NaNO_3) se necesitan 1.7002 g de nitrato de sodio en 10 mL de agua destilada.

✓ **Bajo nitrógeno (-N)**

La cantidad necesaria para obtener la mitad de concentración de nitrato es de 42.505 gramos en 1 litro de agua destilada.

| |
|---|
| N- |
| Cantidad inicial en 1 litro de agua: $85 \text{ g} * \text{L}^{-1}$ |
| Mitad concentración de nitrato de sodio: $X = \frac{85.01}{2} \quad X = 42.505 \text{ g} * \text{L}^{-1}$ |

Estos cálculos se realizan tanto para el nitrato de sodio como para el fosfato de potasio, dando como resultados las siguientes cantidades a emplear.

| Componente | Concentración | Masa empleada |
|--------------------------|---------------|---------------|
| NaNO_3 | Alto | 1.7002 g |
| | Bajo | 0.42505 g |
| K_2HPO_4 | Alto | 0.1742 g |
| | Bajo | 0.04355g |



nitrate de sodio y el fosfato diácido de potasio monohidratado dando como siguientes cantidades a emplear.

| Componente | Concentración | Masa empleada en 10 mL |
|---|---------------|------------------------|
| NaNO ₃ | Alto | 1.5g |
| | Bajo | 0.35 g |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | Alto | 0.1g |
| | Bajo | 0.025g |

Tabla 2.13: Concentración empleada en medio F/2.

2.3.7. Procedimiento para la preparación de medios WC y F/2 con modificación de la concentración de nitrógeno y fósforo

La preparación de los medios de cultivo se realizó de la misma manera que en el punto 2.3.2, previa modificación de los componentes nitrógeno y fósforo. Se prepararon un total de ocho frascos de 500mL de capacidad distribuidos de la siguiente manera:

| Número de frascos de 500 mL de capacidad | Concentración de nitrógeno | Concentración de fósforo |
|--|----------------------------|--------------------------|
| 2 | ALTO | ALTO |
| 2 | ALTO | BAJO |
| 2 | BAJO | ALTO |
| 2 | BAJO | BAJO |

Tabla 2.14: Frascos preparados para el montaje del cultivo.

2.3.8. Procedimiento para el montaje del cultivo modificado

El proceso de siembra para las dos microalgas en estudio, se realiza de la siguiente manera detallada en el punto 2.3.4



2.3.9. Materiales para la extracción de microalgas

| Equipos | Usos |
|--|--------------------------|
| Centrífuga rotor sigma 173/H código 11030 (Shropshire - Reino Unido) | Separación de muestra |
| Microcentrífuga 120 (Hettich código 357574 Föhrenstr. 12- Alemania) | Separación de muestra |
| Balanza Analítica (Boeco) | Peso de reactivos |
| Ultrasonido (LD 20kHz \pm 50KHz) | Rompimiento celular |
| Ultrasonido (Coler-Parmer 8893) | Rompimiento celular |
| Rotavapor | Eliminación del solvente |
| Generador de nitrógeno | Eliminación del solvente |
| Secador al vacío | Eliminación del solvente |
| Campana de Extracción | Extraer vapores tóxicos |

Tabla 2.15: Materiales para la extracción de microalgas.

2.3.10. Procedimiento para la extracción de microalgas

Una vez que los cultivos de microalgas alcanzaron la fase estacionaria de decir el día octavo y séptimo de crecimiento para *Chlorella sp.* y *Nannochloris* respectivamente, se procedió a centrifugar cada muestra durante 5 minutos a 10000 revoluciones por minuto (rpm).

✓ Preparación de extracto

• Fase 1:

La biomasa centrifugada se almacenó en 16 vasos de precipitación de 500 ml capacidad, la cantidad obtenida se pesó en la balanza analítica y se realizó el procedimiento normalizado para la obtención de extractos de microalgas de la siguiente relación:



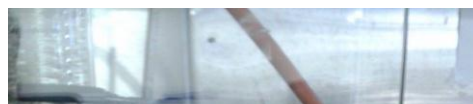
UNIVERSIDAD DE CUENCA.

2. Se aplicó ultrasonido directo a las muestra maceradas a >20 KHz a cada muestra. Este proceso fue realizado en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad de Cuenca (Figura 2.9).



Figura 2.9: Ultrasonificador LD (Tiempo 15min. Temperatura: 10°C).

3. Se maceró las muestras en el ultrasonido por 5 horas a una temperatura de 35°C y se filtró. El filtrado se guardó en refrigeración.
4. Se colocó en un balón de 150 mL de capacidad la parte restante del filtrado y se le añadió 30 mL de metanol absoluto.
5. Se maceró nuevamente en las mismas condiciones por 5 horas y se almacenó con el filtrado anterior.
6. A la parte restante del filtrado se agregó 30 mL de metanol y se volvió a macerar en las mismas condiciones por 5 horas.
7. Se filtró y recolectó con los filtrados anteriores. El sobrenadante del papel filtro se eliminó.
8. Finalmente se concentró los filtrados en el rotavapor a 35°C .





- **Fase 2: Eliminación del solvente**

El solvente restante se eliminó mediante una leve corriente de nitrógeno una cantidad entre 0,5 y 1 mL del extracto aproximadamente. Las muestras colocaron en el secado al vacío por 15 horas para obtener muestras totalmente

2.4. Análisis cuantitativo de flavonoides, polifenoles y carotenoides

- **Espectrofotómetro**

Este tipo de metodología de densidad óptica o absorbancia es muy utilizada para la determinación de biomasa de las microalgas presentando la ventaja de ser rápida y fácilmente. Para poder basarse en este método es necesario realizar una calibración para cada especie que se desee cuantificar (Romo Piñera, 2002)

2.4.1. Materiales para la cuantificación de flavonoides, polifenoles y carotenoides de *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata*

| Equipos | Materiales | Reactivos |
|--|---|---|
| Ultrasonido (Coler-Parmer 8893) | Balones de aforo de 100 y 10 mL | Reactivo de Clorofila a y b, Clorofila c, Clorofila d, Clorofila e, Clorofila f, Clorofila g, Clorofila h, Clorofila i, Clorofila j, Clorofila k, Clorofila l, Clorofila m, Clorofila n, Clorofila o, Clorofila p, Clorofila q, Clorofila r, Clorofila s, Clorofila t, Clorofila u, Clorofila v, Clorofila w, Clorofila x, Clorofila y, Clorofila z |
| Balanza Analítica (Boeco) | Espátula | Ácido cafeico |
| Espectrofotómetro (GENESYS 10 UV SPECTRONIC) | Papel aluminio | Agua destilada |
| Campana de Extracción | Vasos de precipitación de 100 mL | Hidróxido de sodio |
| | Soportes, nudos, pinzas | Metanol |
| | Pera de succión | Quercetina |
| | Embudos de separación con llave de paso, varillas | Acetato de metilo |
| | Papel filtro (Whatman # 4) | Nitrato de aluminio 10% |
| | Pipetas serológicas de 2, 5 y 10 mL | Etanol al 80% |



2.4.2. Procedimiento para la cuantificación de flavonoides, carotenoides de *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata*

✓ Extracción y cuantificación de polifenoles

• Fundamento

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para ser oxidados por agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfotúngstico. (ANEXO C). La transferencia de electrones a pH básico forma complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color a los grupos hidroxilo de la molécula (Cañibano Alberoa, 2012).

• Elaboración de la curva de calibración

Para cuantificar fenoles se realizó el siguiente procedimiento:

Se elaboró una curva o gráfica de absorbancia contra concentraciones de 50 ppm, utilizando una solución patrón de ácido cafeico de 200 ppm. Para ello se pesó 0.1 g de ácido cafeico y se aforó a 100 mL con agua destilada. La concentración de la solución fue de 1000 ppm. Se tomó 20 mL de la solución de 1000 ppm y se diluyó a 100 mL y se obtuvo una solución final de 200 ppm. Posteriormente se elaboraron estándares de acuerdo a la siguiente tabla:

| Volumen de la solución patrón (mL) | Volumen final (mL) | Concentración (ppm) |
|------------------------------------|--------------------|---------------------|
| 2.5 | 100 mL | 5 |
| 5 | 100 mL | 10 |



agitó por 5 minutos, posteriormente se procedió a la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm.

- **Cuantificación en el extracto seco**

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra problema y se disolvió en una mezcla de metanol-agua (1:1). Se llevó la solución hasta un volumen de 5 mL con agua destilada, posteriormente se tomaron 2 mL de la solución anterior y se llevaron a un volumen de 100 mL con agua destilada. A 2 mL de la solución finalmente obtenida se le agregaron 500 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu, y 400 μ L de una solución de NaOH. Se dejó reposar por 5 minutos y posteriormente se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 650 nm. Este procedimiento se realizó con cada una de las especies de microalgas respectivas (Jiménez Herráez & Bravo Rodríguez, 2011).

- ✓ **Extracción y cuantificación de flavonoides**

- **Elaboración de la curva de calibración**

Para la cuantificación de flavonoides se partió de una solución patrón. Para la elaboración de la curva de calibración se pesó 2.7 mg de quercetina en un balón de aforo de 10 mL y se llevó a volumen con etanol al 80%, posteriormente se tomaron alícuotas de 50 y 25 μ L de esta solución en balones de aforo de 10 mL, y se añadió en cada uno 50 μ L de acetato de potasio uno molar (1M) y 200 μ L de nitrato de aluminio al 10% con etanol al 80% y se procedió a su lectura a 415 nm utilizando la técnica de lectura empleando como blanco una solución de todos los reactivos excepto la muestra. Usando esta curva se calculó la concentración de flavonoides totales expresada en mg de quercetina (Jiménez Herráez & Bravo Rodríguez, 2011).

| Volumen de la solución patrón | Volumen final (mL) |
|-------------------------------|--------------------|
|-------------------------------|--------------------|



- **Cuantificación en el extracto seco.**

Se pesó 5 mg del extracto seco de la muestra problema y se disolvió en 1 mL de metanol al 80%, se colocó 100 µL de la solución anterior en un balón de aforo y se le adicionó 200 µL de acetato de potasio 1M y 200 µL de nitrato de aluminio a la solución con metanol al 80%, luego se dejó reposar por 40 minutos y se procedió a medir la absorbancia a 415 nm.

- ✓ **Extracción y cuantificación de carotenoides**

Se pesó 0.3 g del extracto seco y se añadió 0.02 g de Carbonato de magnesio y 1.8 mL de acetona fría (previamente refrigerada por 2 horas). El extracto se filtró usando un papel de filtro Whatman # 4.

Se armó el equipo de destilación y se colocó en el embudo de separación de petróleo, se añadió 1.12 mL del extracto anterior resultante y se dejó reposar por 15 minutos. Se añadió 11.25 mL de agua destilada de tal manera que fluyera por las paredes del embudo. Se dejó separar la mezcla en dos fases, y se decantó la acuosa. Se lavó la fase de éter de petróleo cuatro veces con 7.5 mL de agua destilada con el objeto de eliminar la acetona residual. La fase de éter de petróleo se colocó en un tubo de ensayo, para lo cual previamente se pasó dicha fase a través de un tubo que contuvo 0.5 g de sulfato de sodio anhidro con el objeto de eliminar el agua residual. Posteriormente, el embudo de separación se lavó con éter de petróleo y se agregó un volumen de 2 mL con éter de petróleo. El contenido total de carotenoides se midió en el espectrofotómetro a 450 nm (Sahabi, Shehu, Y., & A.S, 2012).

Para obtener la cantidad de carotenoides en las microalgas se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g}) = (E \cdot v \cdot 10^6) / (E^{1\%}_{1\text{cm}} \cdot 100 \cdot p)$$



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

P Peso de la muestra (g)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 2500 Coeficiente de extinción de carotenoides de una solución al
una cubeta con 1cm de paso de luz (Garcia & Flores)



CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación de la fase estacionaria y foto-periodo ideal para *Nannochloropsis oculata*.

A partir de los recuentos celulares realizados mediante la cámara de Neubauer para *Chlorella sp.* como de *Nannochloropsis oculata*, se logró determinar mediante el análisis de la tasa de crecimiento geométrico la fase estacionaria y foto-periodo ideal para la cepa mencionada.

El análisis se realizó a partir del día uno posterior a la fecha de siembra de las cepas, hasta el día 13, en el cual se presentó un descenso significativo de las densidades poblacionales de las dos cepas en estudio. Cada día, las 16 muestras fueron tomadas y analizadas por triplicado; de tal manera que las tablas correspondientes a cada especie muestran el promedio de las tres cantidades obtenidas diariamente.

3.1.1. Resultados del máximo crecimiento de *Chlorella sp.*

En la tabla 3.1 se puede observar los siguientes parámetros partiendo de la izquierda a la derecha: número de estante, tiempo de exposición a la luz artificial, temperatura de cultivo, número de balón y el día en el cual se obtuvo la mayor densidad poblacional para *Chlorella sp.*

| Nº de estante | Tiempo de exposición a luz artificial (hrs) | Temperatura (°C) | Nº de balón | DÍA 8 (concentración celular/µL) |
|---------------|---|------------------|-------------|-------------------------------------|
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |
| | | | 4 | |
| | | | 5 | |



| | | | | |
|------------------|----|-------|----|--|
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | |
| | | | 14 | |
| | | | 15 | |
| | | | 16 | |

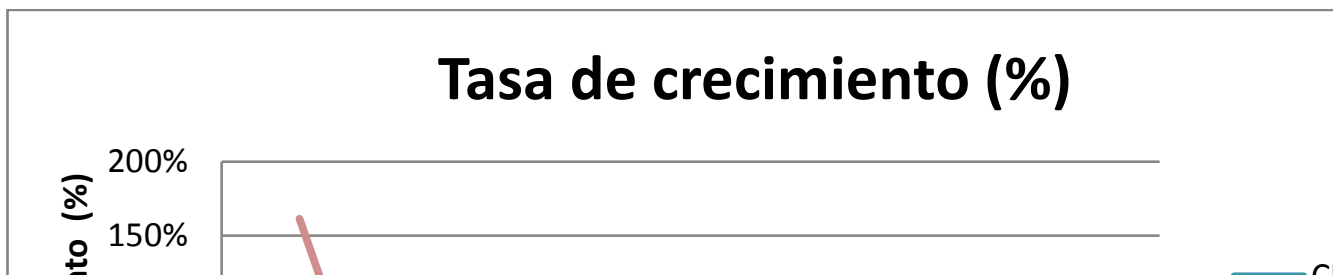
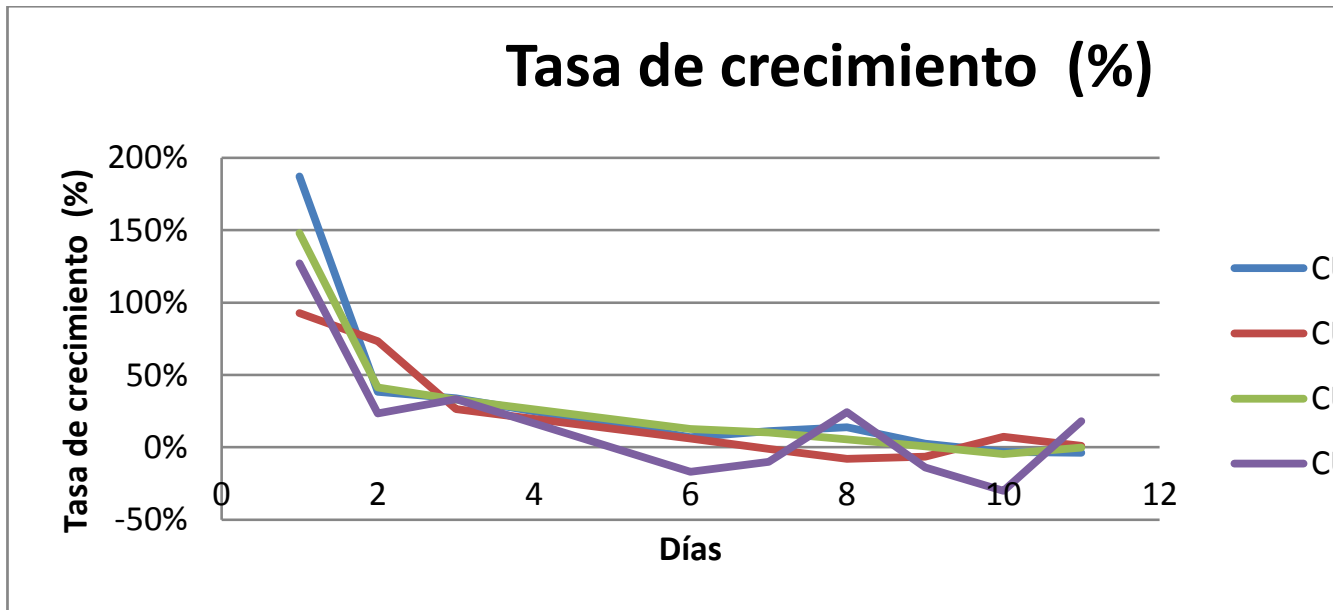
Tabla 3.1: Día de mayor obtención de la densidad poblacional de *Chlorella* s

3.1.2. Determinación de la tasa de crecimiento geométrico de C

Para determinar con mayor confiabilidad el inicio y final de cada fase celular, se realizó un análisis de la tasa de crecimiento geométrico (ANEXO) la siguiente fórmula:

$$r = \left(\frac{p^{t+n}}{p^t} \right)^{\frac{1}{a}} - 1$$

(Torre



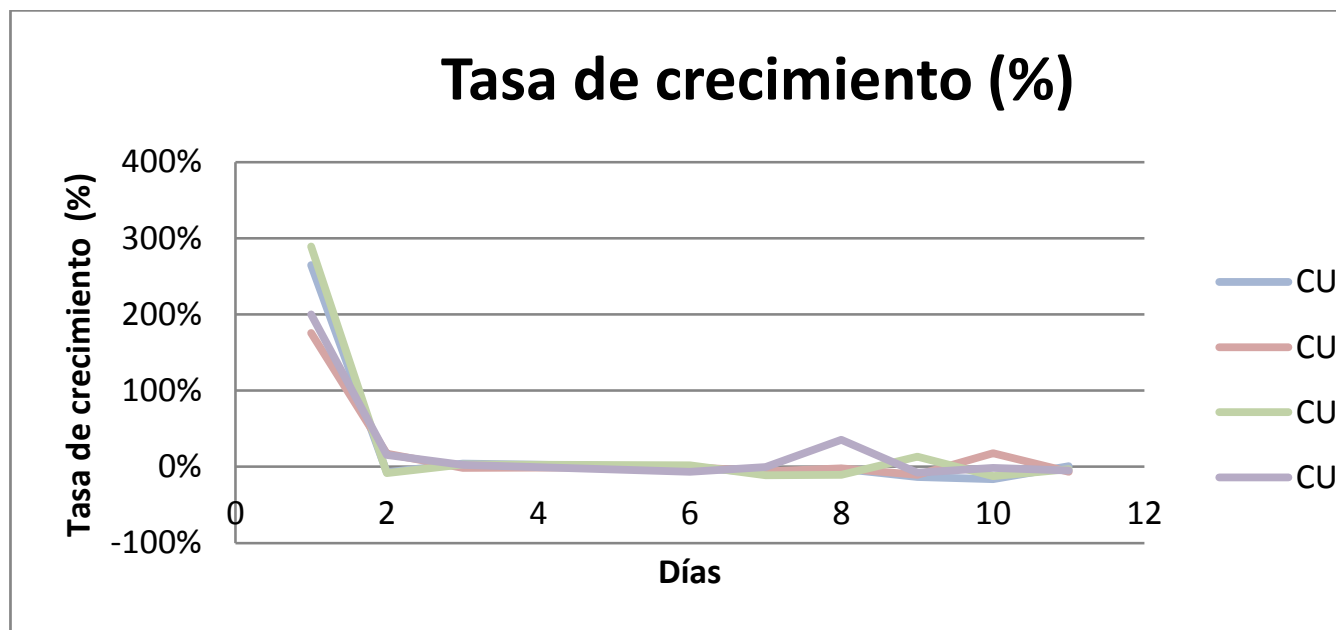
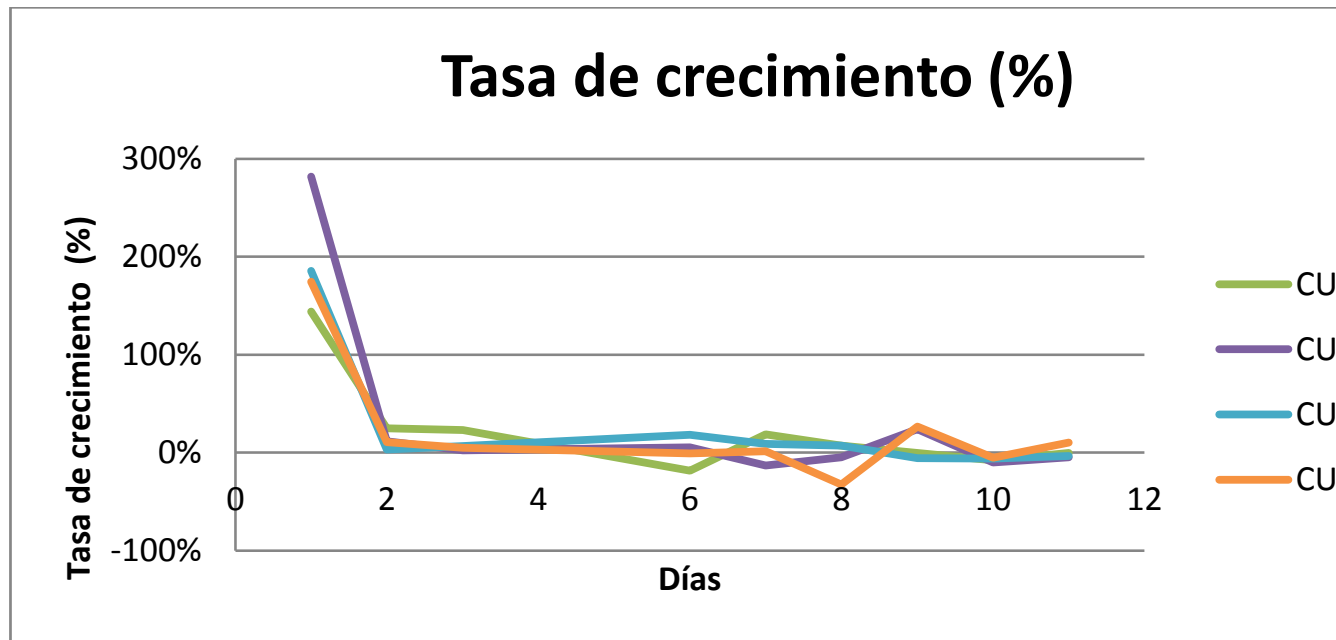


Figura 3.1: Tasa de crecimiento de *Chlorella sp.*

De las figuras resultantes se puede observar que el día óptimo de crecimiento estacionario de *Chlorella sp.*, es el día octavo ya que corresponde a la fase en la cual la población se mantiene constante.

Cabe resaltar que en las figuras resultantes no se observa la fase de latencia luego de la fase estacionaria debido a que el objetivo fue iniciar un nuevo ciclo de cultivo para la obtención de la mayor cantidad de biomasa.

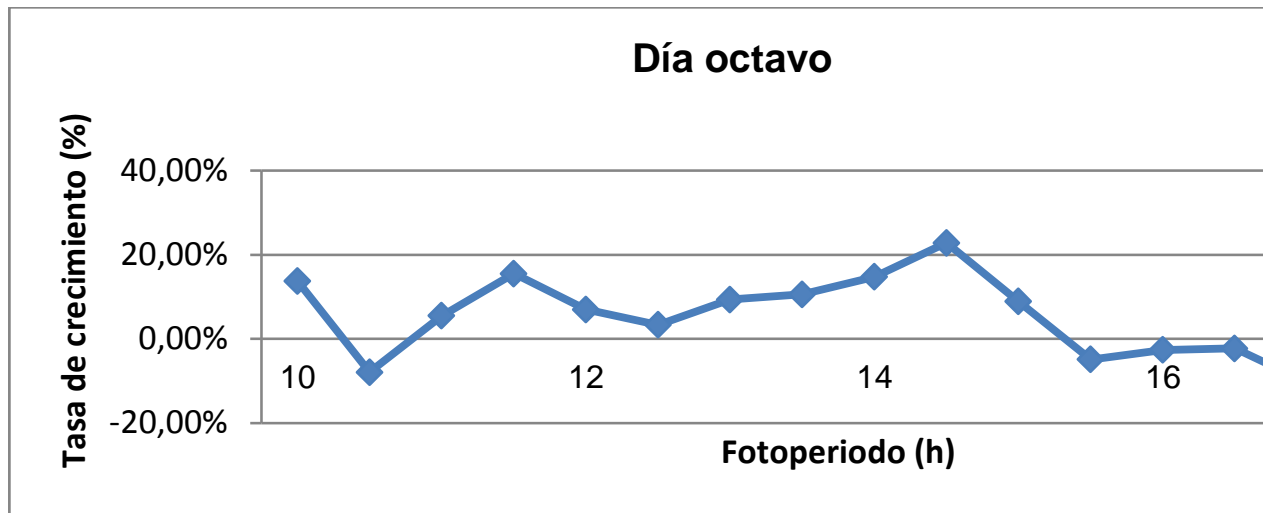
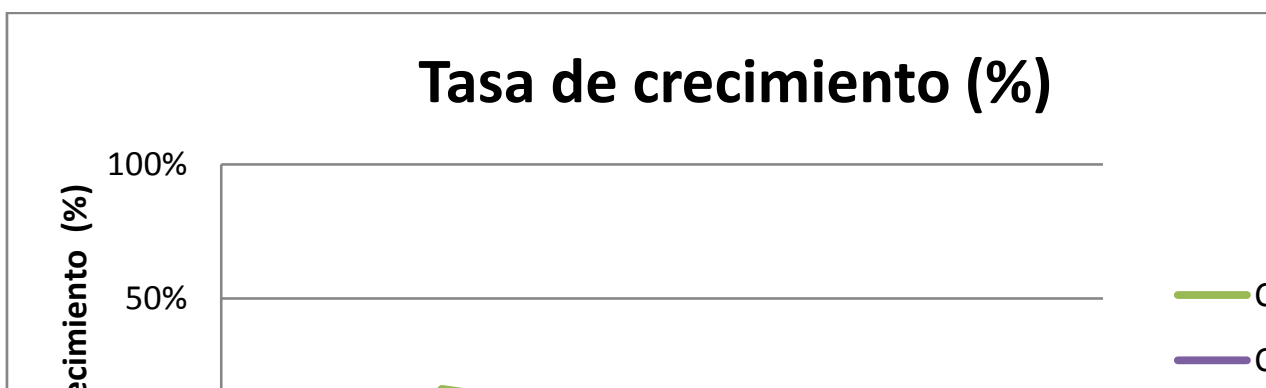
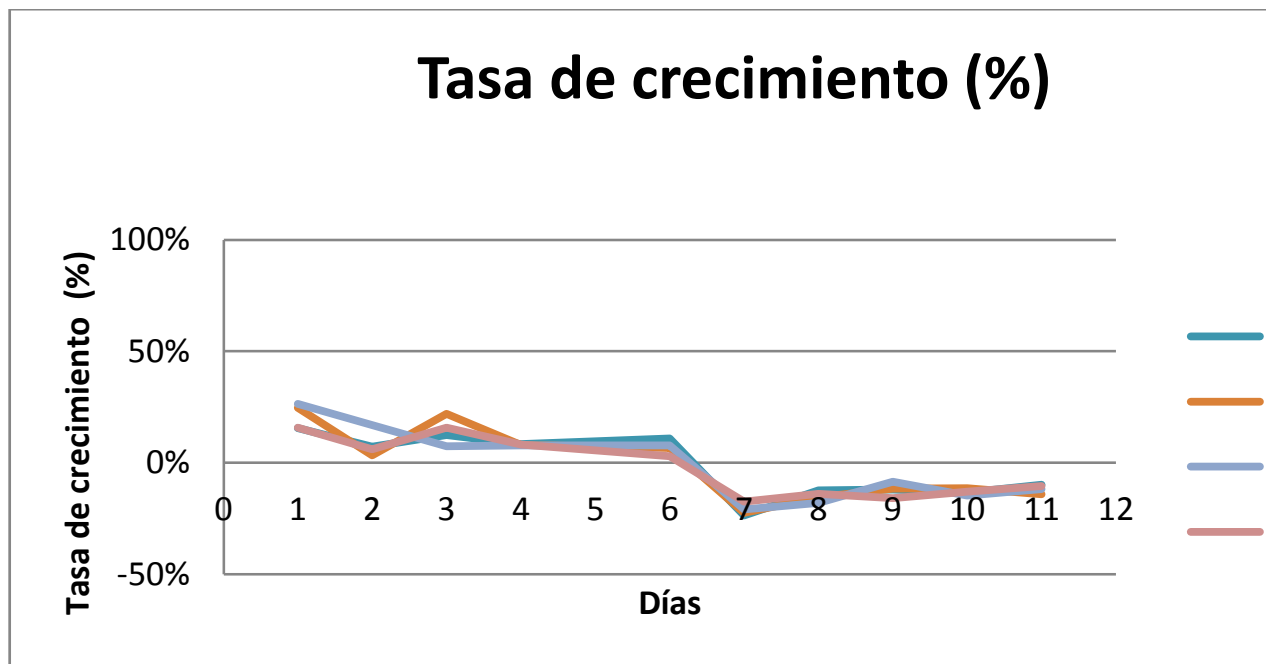
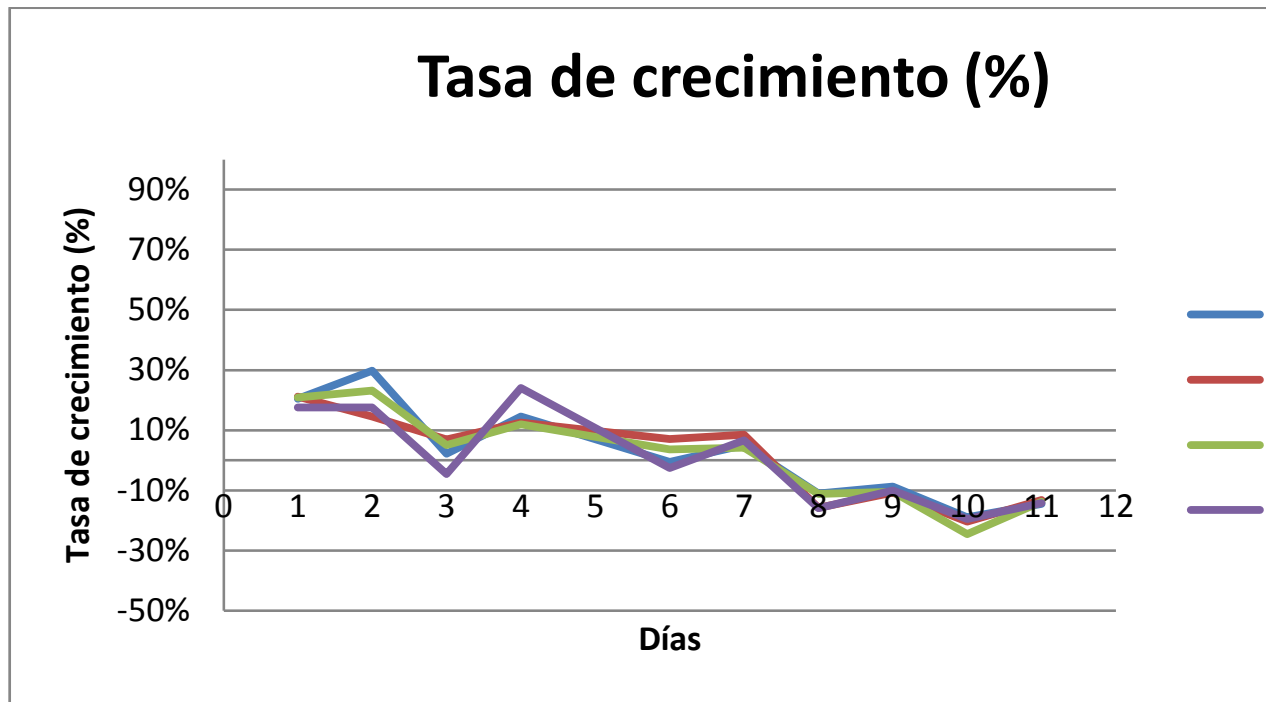


Figura 3.2: Foto-periodos correspondientes al octavo día de crecimiento celular de *C.*

3.1.4. Resultados del máximo crecimiento de *Nannochloropsis*

| N° de estante | Tiempo de exposición a luz artificial (hrs) | Temperatura (°C) | N° de balón | (Conc |
|---------------|---|------------------|-------------|-------|
| | | | | c |
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |
| | | | 4 | |
| Estante 2 | 12 | 34-37 | 5 | |
| | | | 6 | |
| | | | 7 | |
| | | | 8 | |
| Estante 3 | 14 | 33-35 | 9 | |
| | | | 10 | |
| | | | 11 | |
| | | | 12 | |
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | |
| | | | 14 | |
| | | | 15 | |
| | | | 16 | |

Tabla 3.2: Día de máxima obtención de la densidad poblacional de *Nannochloropsis*



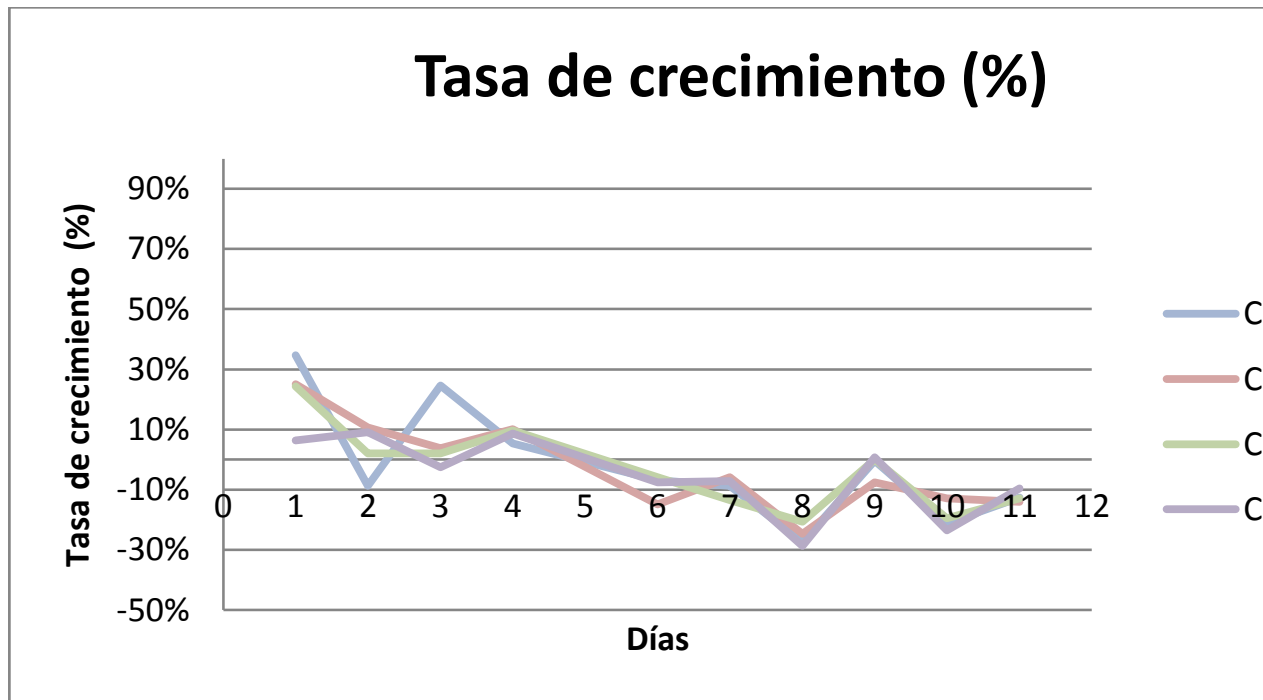


Figura 3.3: Tasa de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*.

3.1.6. Determinación del foto-periodo ideal para *Nannochloropsis oculata*

A partir del día octavo se realizó una gráfica de dispersión (Figura 3.4.) en la que se muestra la tasa de crecimiento únicamente del día mencionado versus los cuatro los fotoperiodos estudiados, obteniendo como resultado que el mejor foto-periodo es de 10 horas de luz y 14 horas de oscuridad.

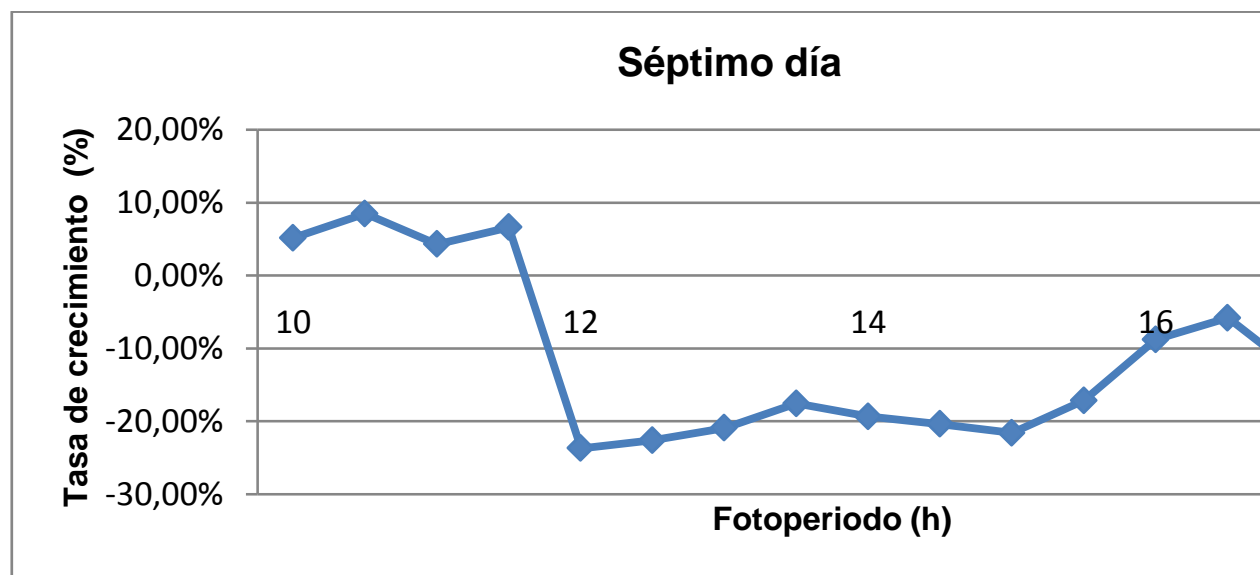


Figura 3.4: Foto periodos correspondientes al séptimo día de crecimiento celular de *Nannochloropsis oculata*.



medios de cultivo de iguales características (Tabla 3.3) y se empleó para la calibración de flavonoides, y polifenoles a partir de disoluciones patrón en el capítulo 2 numeral 2.4.2.

| GRUPOS | CONCENTRACIÓN NITRÓGENO | CONCENTRACIÓN FÓSFORO |
|--------|-------------------------|-----------------------|
| 1 A | ALTA (+N) | ALTA (+P) |
| 2 B | ALTA (+N) | BAJA (-P) |
| 3 C | BAJA (-N) | ALTA (+P) |
| 4 D | BAJA (-N) | BAJA (-P) |

Tabla 3.3: Grupos formados para el análisis de metabolitos secundarios.

3.2.1. Análisis cuantitativo de flavonoides en *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata*.

Para obtener la concentración de flavonoides tanto de *Chlorella sp.* como de *Nannochloropsis oculata*, se realizó una curva de calibración utilizando quercetina.

3.2.1.1. Curva de calibración de flavonoides en *Chlorella sp*

| Curva de calibración de flavonoides | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Patrón: quercetina | |
| CONCENTRACIÓN mg/mL | ABSORBANCIA (415 nm) |
| 175 | 0.31 |
| 100 | 0.152 |
| 50 | 0.052 |
| 25 | 0.027 |
| 0 | 0 |

Tabla 3.4: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración.

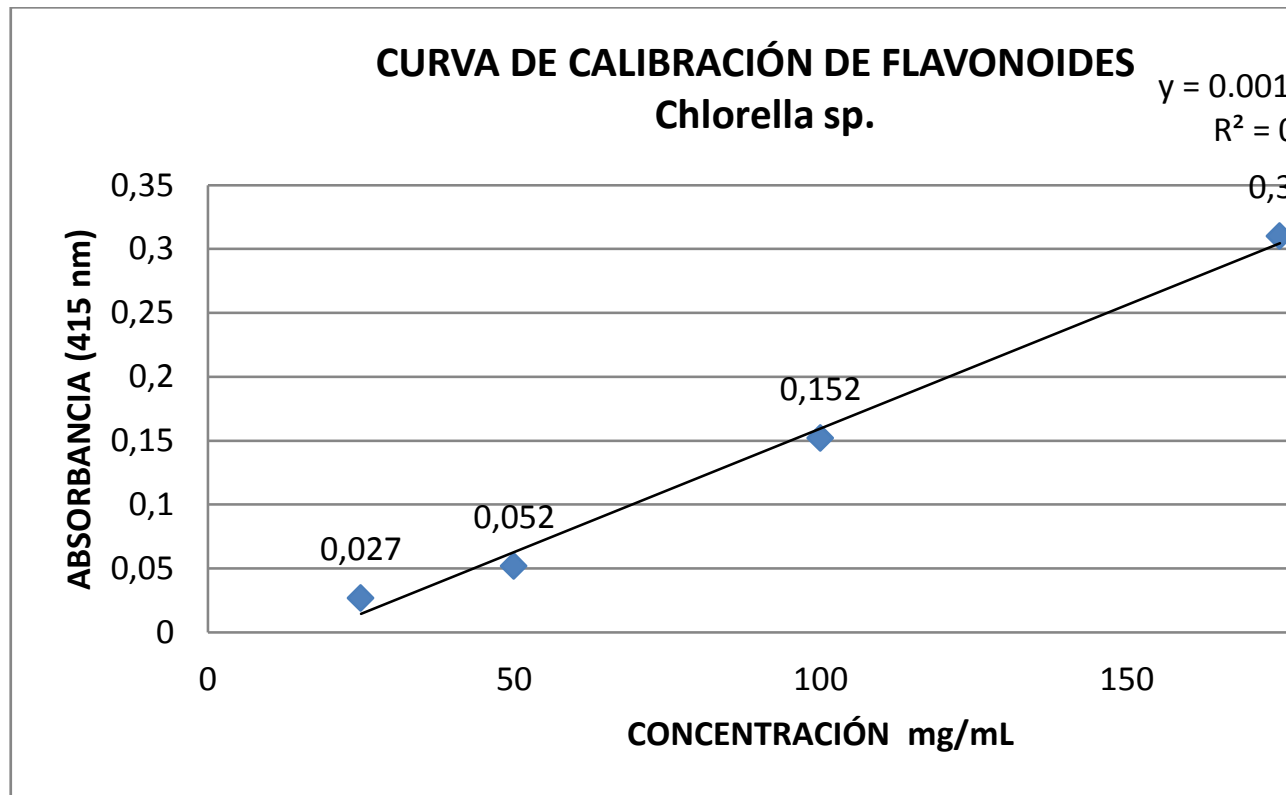


Figura 3.5: Curva de calibración de flavonoides en *Chlorella sp.*

GRUPO 1 (+N+P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (mg/mL) |
|-------------------|-------------|-----------------------|
| 1A | 0.154 | 154 |
| 2B | 0.159 | 159 |
| 3C | 0.157 | 157 |
| 4D | 0.172 | 172 |

GRUPO 2 (+N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (mg/mL) |
|-------------------|-------------|-----------------------|
| 2A | 0.07 | 70 |
| 1B | 0.067 | 67 |
| 4C | 0.07 | 70 |



| | | |
|----|-------|--|
| 4B | 0.042 | |
| 1C | 0.048 | |
| 2D | 0.039 | |

GRUPO 4 (-N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (m |
|-------------------|-------------|------------------|
| 4A | 0.038 | |
| 3B | 0.034 | |
| 2C | 0.037 | |
| 1D | 0.039 | |

Tabla 3.5: Concentración de flavonoides en *Chlorella sp.*

3.2.1.2. Curva de calibración de flavonoides en *Nannochloris oculata*

| Curva de calibración de flavonoides | |
|-------------------------------------|----------------------|
| Patrón: quercetina | |
| CONCENTRACIÓN mg/mL | ABSORBANCIA (415 nm) |
| 700 | 0.951 |
| 350 | 0.431 |
| 175 | 0.205 |
| 100 | 0.111 |
| 50 | 0.059 |

Tabla 3.6: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración

A partir de los datos obtenidos (Tabla 3.6), se graficó la curva de calibración y se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0.9977.

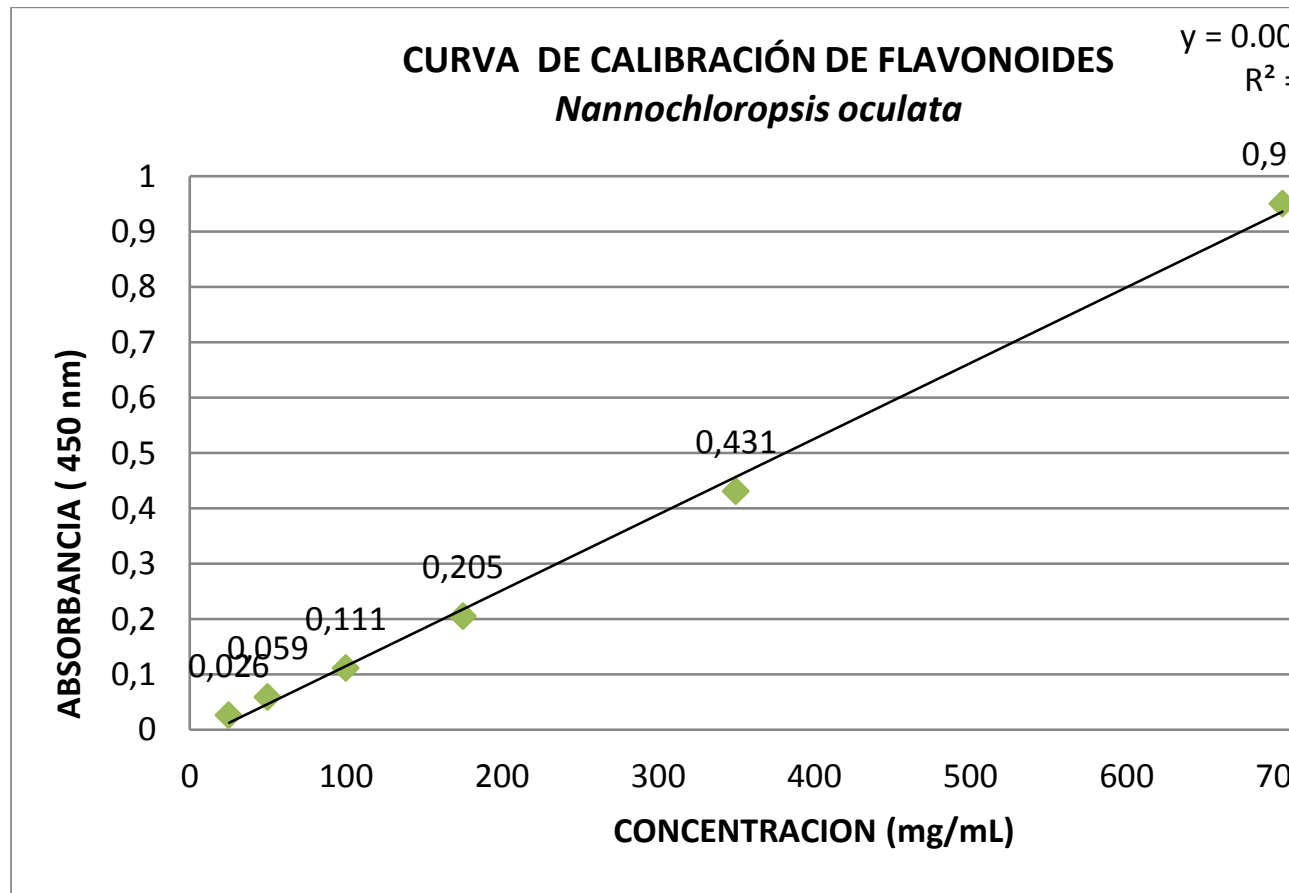


Figura 3.6: Curva de calibración de flavonoides en *Nannochloropsis oculata*

GRUPO 1 (+N+P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (|
|-------------------|-------------|-----------------|
| 1A | 0.068 | |
| 2B | 0.077 | |
| 3C | 0.069 | |
| 4D | 0.073 | |

GRUPO 2 (+N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (|
|-------------------|-------------|-----------------|
| 2A | 0.038 | |
| 1B | 0.035 | |



| | |
|----|-------|
| 3A | 0.029 |
| 4B | 0.027 |
| 1C | 0.025 |
| 2D | 0.03 |

GRUPO 4 (-N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (|
|-------------------|-------------|-----------------|
| 4A | 0.02 | |
| 3B | 0.026 | |
| 2C | 0.023 | |
| 1D | 0.028 | |

Tabla 3.7: Concentración de flavonoides en *Nannochloropsis oculata*.

3.2.2. Análisis cuantitativo de polifenoles en *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata*.

Para obtener la concentración de polifenoles tanto de *Chlorella sp.* como de *Nannochloropsis oculata*, se realizó una curva de calibración según el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito en la metodología, utilizando como patrón ácido cafeico.

3.2.2.1. Curva de calibración de polifenoles en *Chlorella sp.*

| Curva de calibración de polifenoles | |
|-------------------------------------|----------------------|
| Patrón: Ac. cafeico | |
| CONCENTRACIÓN (ppm) | ABSORBANCIA (650 nm) |
| 0 | 0 |
| 5 | 0.084 |

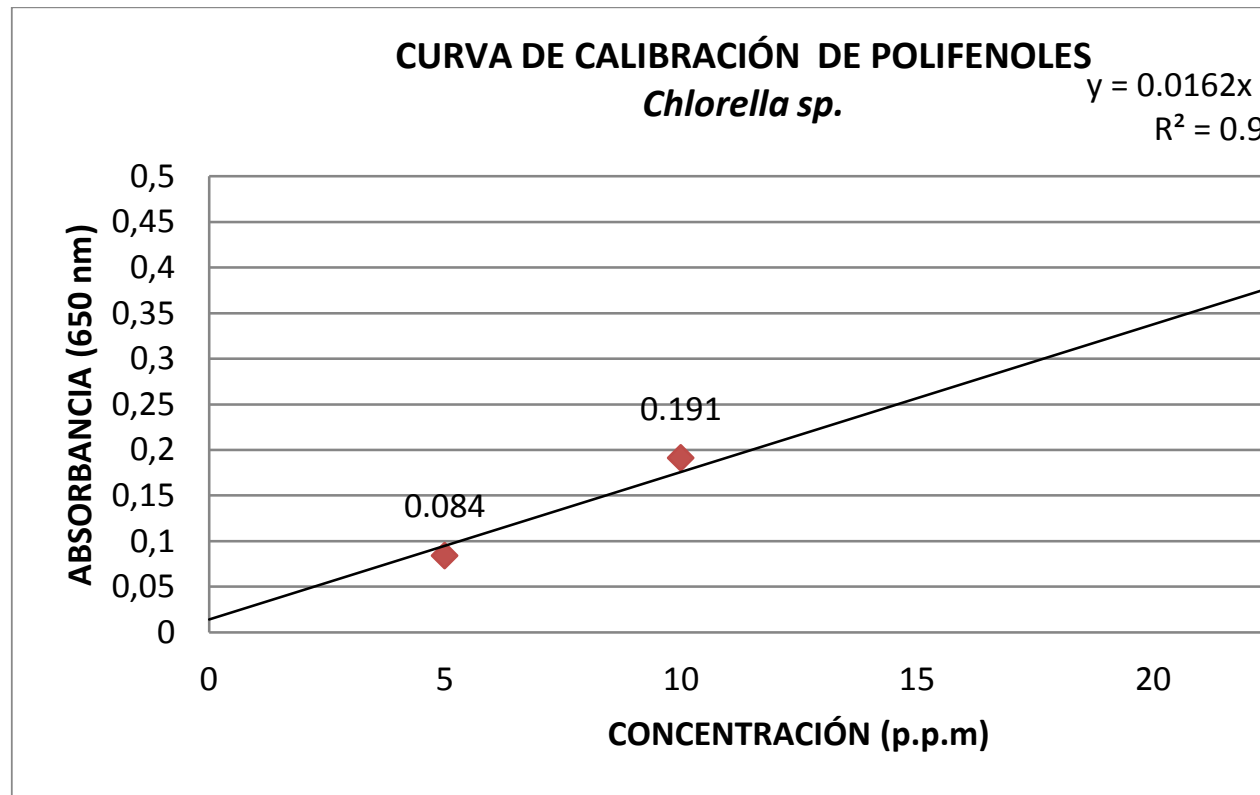


Figura 3.7: Curva de Calibración de polifenoles en *Chlorella sp.*

GRUPO 1 (+N+P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|-------------------|-------------|---------------|
| 1A | 0.214 | |
| 2B | 0.213 | |
| 3C | 0.211 | |
| 4D | 0.208 | |

GRUPO 2 (+N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|-------------------|-------------|---------------|
| 2A | 0.149 | |
| 1B | 0.151 | |
| 4C | 0.146 | |
| 3D | 0.152 | |



| | | |
|----|------|--|
| 2D | 0.11 | |
|----|------|--|

| GRUPO 4 | | (-N-P) |
|-------------------|-------------|---------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
| 4A | 0.078 | |
| 3B | 0.08 | |
| 2C | 0.079 | |
| 1D | 0.077 | |

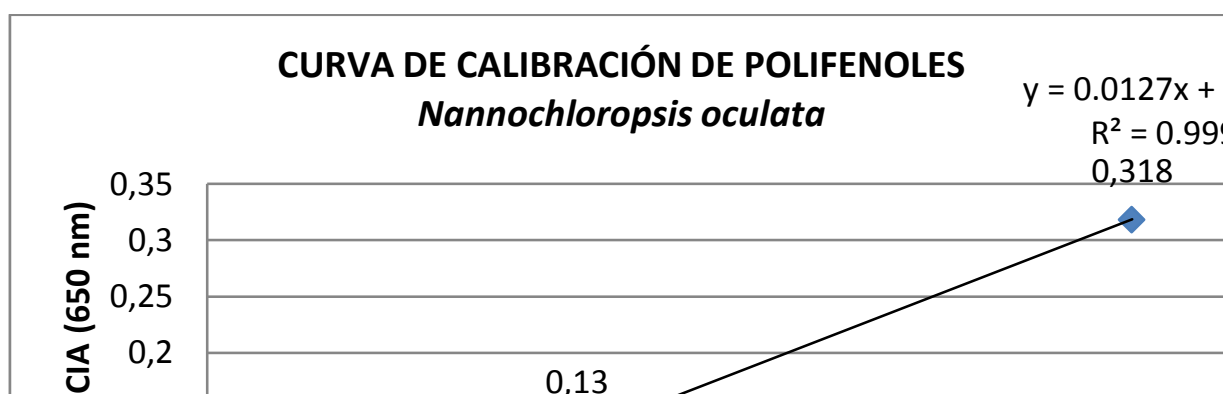
Tabla 3.9: Concentración de polifenoles en *Chlorella sp.*

3.2.2.2. Curva de calibración de polifenoles en *Nannochlo*

| Curva de calibración Polifenoles | |
|----------------------------------|----------------------|
| Patrón: Ac. cafeico | |
| CONCENTRACIÓN (ppm) | ABSORBANCIA (650 nm) |
| 0 | 0 |
| 5 | 0.062 |
| 10 | 0.13 |
| 25 | 0.318 |

Tabla 3.10: Resultados obtenidos de las soluciones patrón para la curva de calibración

A partir de los datos obtenidos (Tabla 3.10), se graficó la curva de calibración y se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9997.





UNIVERSIDAD DE CUENCA.

GRUPO 1

(+N+P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| 1A | 0.128 | |
| 2B | 0.114 | |
| 3C | 0.119 | |
| 4D | 0.121 | |

GRUPO 2

(+N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| 2A | 0.083 | |
| 1B | 0.088 | |
| 4C | 0.081 | |
| 3D | 0.09 | |

GRUPO 3

(-N+P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| 3A | 0.077 | |
| 4B | 0.078 | |
| 1C | 0.076 | |
| 2D | 0.075 | |

GRUPO 4

(-N-P)

| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN |
|--------------------------|--------------------|----------------------|
| 4A | 0.069 | |



3.2.3. Análisis cuantitativo de carotenoides en *Chlorella* *Nannochloropsis oculata*

Para obtener la concentración de carotenoides en las microalgas en estudio se aplicó el procedimiento descrito en el capítulo 2 y con las lecturas obtenidas, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/g}) = (E \cdot v \cdot 10^6) / (E^{1\%}_{1\text{cm}} \cdot 100 \cdot p)$$

(Rodríguez)

3.2.3.1. Cuantificación de carotenoides en *Chlorella* sp.

En la tabla 3.12 partiendo de izquierda a derecha se observa los siguientes medios de cultivo, absorbancia y concentración de carotenoides.

| GRUPO 1 (+N+P) | | |
|-------------------|-------------|-----------------------------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/g}$) |
| 1A | 0.681 | 17.53 |
| 2B | 0.65 | 16.73 |
| 3C | 0.696 | 17.92 |
| 4D | 0.634 | 16.32 |

| GRUPO 2 (+N- | |
|-------------------|-------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA |
| 2A | 0.31 |
| 1B | 0.325 |
| 4C | 0.299 |
| 3D | 0.301 |

| GRUPO 3 (-N+P) | | |
|-------------------|-------------|-----------------------------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/g}$) |
| 3A | 0.41 | 10.55 |
| 4B | 0.436 | 11.22 |
| 1C | 0.453 | 11.66 |
| 2D | 0.5 | 12.87 |

| GRUPO 4 (-N- | |
|-------------------|-------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA |
| 4A | 0,282 |
| 3B | 0,298 |
| 2C | 0,265 |
| 1D | 0,203 |

Tabla 3.12: Concentración de carotenoides en *Chlorella* sp.



3.2.3.2. Cuantificación de carotenoides en *Nannochloropsis*

| GRUPO 1 (+N+P) | | |
|-------------------|-------------|----------------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (µg/g) |
| 1 ^a | 0.45 | 11.58 |
| 2B | 0.433 | 11.15 |
| 3C | 0.425 | 10.94 |
| 4D | 0.427 | 10.99 |

| GRUPO 2 (+N- | |
|-------------------|-------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA |
| 2A | 0.159 |
| 1B | 0.147 |
| 4C | 0.152 |
| 3D | 0.159 |

| GRUPO 3 (-N+P) | | |
|-------------------|-------------|----------------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA | CONCENTRACIÓN (µg/g) |
| 3 ^a | 0.342 | 8.8 |
| 4B | 0.329 | 8.47 |
| 1C | 0.347 | 8.93 |
| 2D | 0.337 | 8.67 |

| GRUPO 4 (-N- | |
|-------------------|-------------|
| MEDIOS DE CULTIVO | ABSORBANCIA |
| 4A | 0.135 |
| 3B | 0.127 |
| 2C | 0.13 |
| 1D | 0.132 |

Tabla 3.13: Concentración de carotenoides en *Nannochloropsis oculata*.

3.2.4. Resultados de ANOVA sobre la cuantificación de flavonoides en *Chlorella sp.*

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|---|--------------------|--|
| Factores | Significado | Prob > p (α= 0.05) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides. |
| G1 | Nitrógeno | 0.0003 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 0.0011 | ✓ |
| G3 | Organización de medios de cultivo por filas | 0.9563 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0016 | ✓ |
| G1 * G3 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.8986 | X |
| G2 * G3 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.842 | X |



| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|--|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides. |
| G1 | Nitrógeno | < 0.001 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 0.0002 | ✓ |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.3576 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0002 | ✓ |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.2601 | X |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.5851 | X |

Tabla 3.15: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas e

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|--|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides. |
| G1 | Nitrógeno | 1.13498e - 012 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 1.1735e - 010 | ✓ |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 5.6008e - 010 | ✓ |

Tabla 3.16: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en *Chlorella sp.*

- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la determinación de flavonoides en *Chlorella sp.***

Representación:

| X1→ Nitrógeno | X2→ Fósforo |
|--|--|
| Línea continua azul (—) X1=0 : concentración BAJA de nitrógeno | Línea continua azul (—) X2=0 : concentración BAJA de fósforo |
| Línea entrecortada (- - -) X1=1: | Línea entrecortada (- - -) |

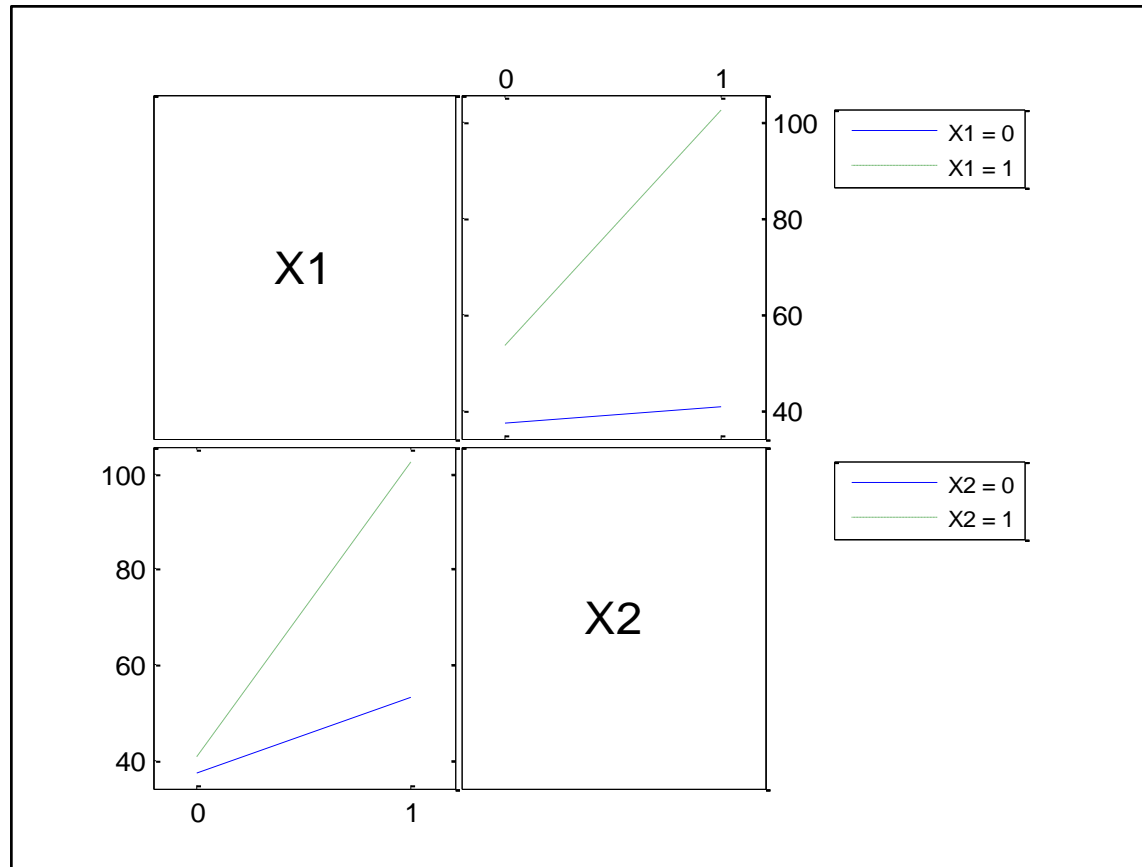


Figura 3.9: Gráfico de Interacción *Chlorella sp.*

En la figura 3.9 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2:

a) Primer caso:

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**

| | |
|----|----|
| -N | -P |
| -N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración baja de nitrógeno concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final sube de aproximadamente 37 a 40 mg/mL.

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**

| | |
|----|----|
| +N | -P |
| +N | +P |



b) Segundo caso:

- ✓ **Fósforo constante en su nivel bajo (-P):**

| | |
|----|----|
| -P | -N |
| -P | +N |

Al mantener la concentración baja de fósforo y variar las concentraciones de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de flavonoides sube de aproximadamente 37 a 53 mg/mL.

- ✓ **Fósforo constante en su nivel alto (+P):**

| | |
|----|----|
| +P | -N |
| +P | +N |

Al mantener la concentración alta de fósforo y variar las concentraciones de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de flavonoides sube de aproximadamente 37 a 102 mg/mL.

En ambos casos las pendientes respectivas a X1 y X2 (figura 4.12) al no ser paralelas indica que sí existe interacción entre ellas; es decir la concentración final de flavonoides depende de las concentraciones tanto de nitrógeno como de fósforo.

3.2.5. Resultados de ANOVA sobre la cuantificación de polifenoles

Chlorella sp.

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------------|---|--|
| Factores | Significado | Prob > p (α= 0.05) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles | |
| G1 | Nitrógeno | < 0,001 | ✓ | |
| G2 | Fósforo | 0.0001 | ✓ | |
| G3 | Organización de | 0.5102 | ✓ | |



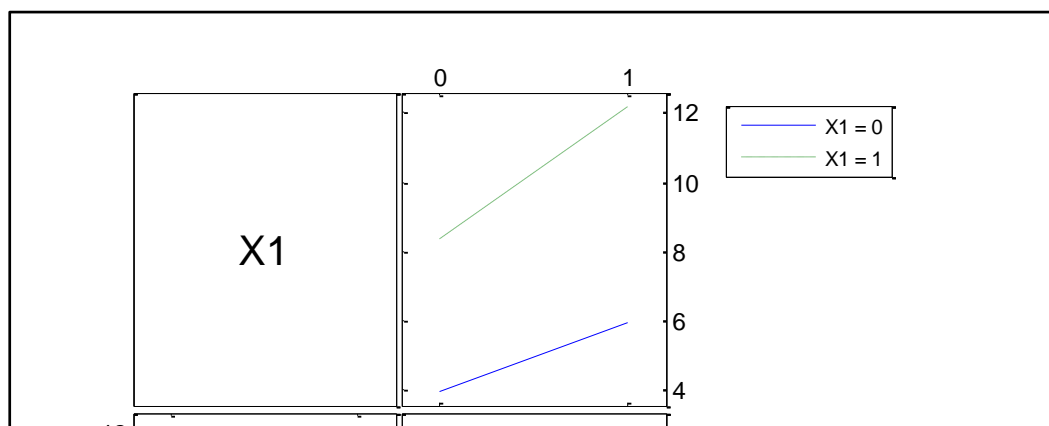
| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles |
| G1 | Nitrógeno | < 0.001 | ✓ |
| G2 | Fósforo | < 0.001 | ✓ |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.1797 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0002 | ✓ |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.1079 | X |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.6884 | X |

Tabla 3.19: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles |
| G1 | Nitrógeno | 1.05758e - 017 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 1.52103e - 014 | ✓ |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 8.77307e - 009 | ✓ |

Tabla 3.20: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en *Chlorella sp.*

- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la determinación de polifenoles en *Chlorella sp.***





En la figura 3.10 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2

a) Primer caso:

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**

| | |
|----|----|
| -N | -P |
| -N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración baja de nitrógeno y variar las concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final de polifosfatos sube de aproximadamente 4 a 6 ppm.

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**

| | |
|----|----|
| +N | -P |
| +N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración alta de nitrógeno y variar las concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final de polifosfatos sube de aproximadamente 8 a 12 ppm.

b) Segundo caso:

- ✓ **Fósforo constante en su nivel bajo (-P):**

| | |
|----|----|
| -P | -N |
| -P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración baja de fósforo y variar las concentraciones de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de polifosfatos sube de aproximadamente de 4 a 8 ppm.

- ✓ **Fósforo constante en su nivel alto (+P):**



3.2.6. Resultados de la cuantificación de carotenoides en *Chlo*

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|--|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de carotenoides | |
| G1 | Nitrógeno | 0.0105 | ✓ | S |
| G2 | Fósforo | 0.0013 | ✓ | |
| G3 | Organización de medios de cultivo por filas | 0.9285 | X | |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0345 | ✓ | |
| G1 * G3 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.9439 | X | |
| G2 * G3 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.6094 | X | |

Tabla 3.21: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|--|--------|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de carotenoides | |
| G1 | Nitrógeno | 0.0083 | ✓ | S y |
| G2 | Fósforo | 0.001 | ✓ | |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.9089 | X | |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0278 | ✓ | |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.6058 | X | |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.7457 | X | |

Tabla 3.22: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|-------------|----------------------------------|--|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de carotenoides | |
| G1 | Nitrógeno | < 0.001 | ✓ | C |
| G2 | Fósforo | < 0.001 | ✓ | |



- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la determinación de carotenoides en *Chlorella sp.***

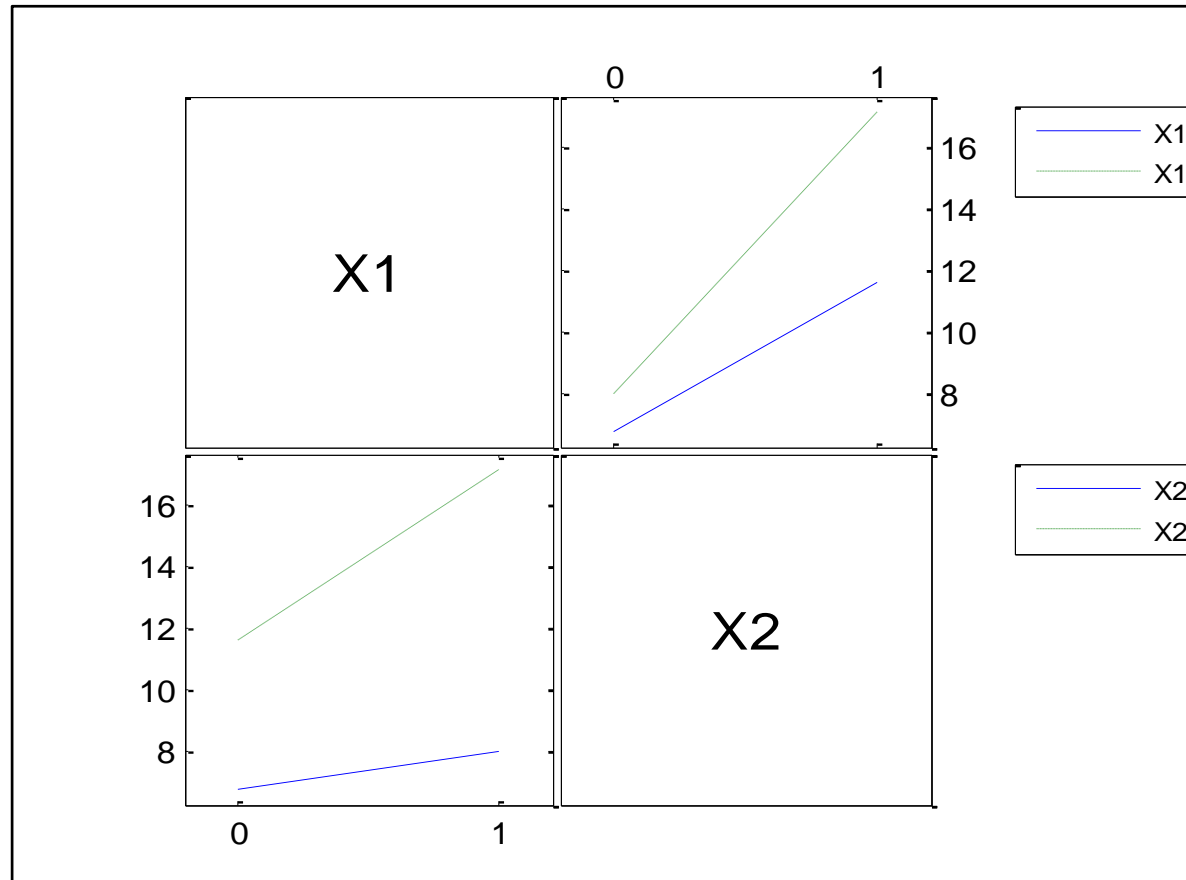


Figura 3.11: Gráfico de interacción *Chlorella sp.*

En la figura 3.11 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2

a) Primer caso:

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**

| | |
|----|----|
| -N | -P |
| -N | +P |

Al mantener la concentración baja de nitrógeno y variar las concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final de carotenoides sube de aproximadamente 7.5 mg/mL a 11 mg/mL.

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**



b) Segundo caso:

- ✓ **Fósforo constante en su nivel bajo (-P):**

| | |
|----|----|
| -P | -N |
| -P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración baja de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de caroten aproximadamente de 6 a 8 mg/mL.

- ✓ **Fósforo constante en su nivel alto (+P):**

| | |
|----|----|
| +P | -N |
| +P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración alta de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de caroten aproximadamente 11 a 17 mg/mL.

3.2.7. Resultados de la cuantificación de flavonoides en *Nannococcoloba oculata*.

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|---|-----------------------|--|--|
| Factores | Significado | Prob > p (α= 0.05) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides. | |
| G1 | Nitrógeno | 0.0009 | ✓ | |
| G2 | Fósforo | 0.004 | ✓ | |
| G3 | Organización de medios de cultivo por filas | 0.431 | X | |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0076 | ✓ | |
| G1 * G3 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.9758 | X | |



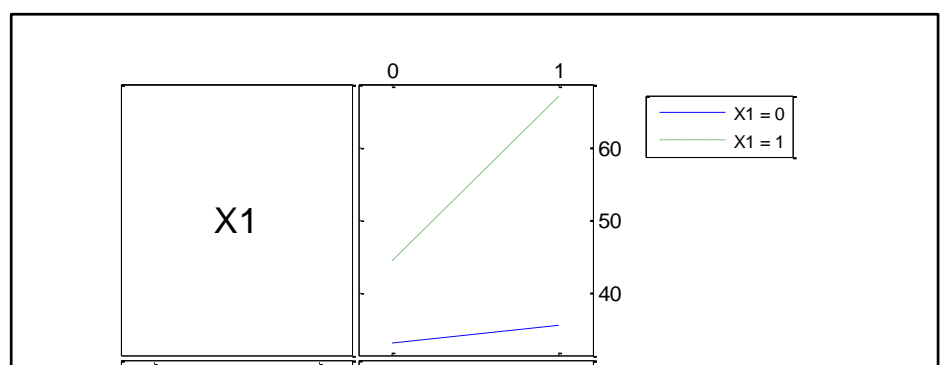
| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|--|--------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides |
| G1 | Nitrógeno | 0.0005 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 0.0022 | ✓ |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.5641 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0042 | ✓ |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.5003 | X |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.3561 | X |

Tabla 3.25: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en *Nannochloropsis oculata*.

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de flavonoides |
| G1 | Nitrógeno | 1.91579e - 009 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 6.86308e - 007 | ✓ |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 6.81217e - 006 | ✓ |

Tabla 3.26: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en *Nannochloropsis oculata*.

- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la determinación de flavonoides en *Nannochloropsis oculata***





En la figura 3.12 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2

a) Primer caso:

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**

| | |
|----|----|
| -N | -P |
| -N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración baja de nitrógeno concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final sube de aproximadamente 33 a 36 mg/mL.

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**

| | |
|----|----|
| +N | -P |
| +N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración alta de nitrógeno concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final sube de aproximadamente 44 a 67 mg/mL.

b) Segundo caso:

- ✓ **Fósforo constante en su nivel bajo (-P):**

| | |
|----|----|
| -P | -N |
| -P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración baja de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de flavon aproximadamente de 33 a 44 mg/mL.



Aparentemente al mantener la concentración alta de fósforo y variar las concentraciones de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de flavonoides fue aproximadamente 35 a 67 mg/mL.

3.2.8. Resultados de la cuantificación de polifenoles en *Nasturtium officinale*:

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles |
| G1 | Nitrógeno | 0.0011 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 0.0031 | ✓ |
| G3 | Organización de medios de cultivo por filas | 0.8432 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0115 | ✓ |
| G1 * G3 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.7064 | X |
| G2 * G3 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.6798 | X |

Tabla 3.27: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en *Nasturtium officinale*

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|---|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles |
| G1 | Nitrógeno | 0.0003 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 0.0007 | ✓ |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.3856 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.0028 | ✓ |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.2316 | X |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.4115 | X |



| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | | |
|-------------------------|---|--------------------------------|---|---------|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de polifenoles | |
| G1 | Nitrógeno | 1.54705e - 009 | ✓ | |
| G2 | Fósforo | 8.09025e - 008 | ✓ | Se s |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 9.6196e - 006 | ✓ | |

Tabla 3.29: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en *Nannochloropsis oculata*

- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la detección de polifenoles en *Nannochloropsis oculata***

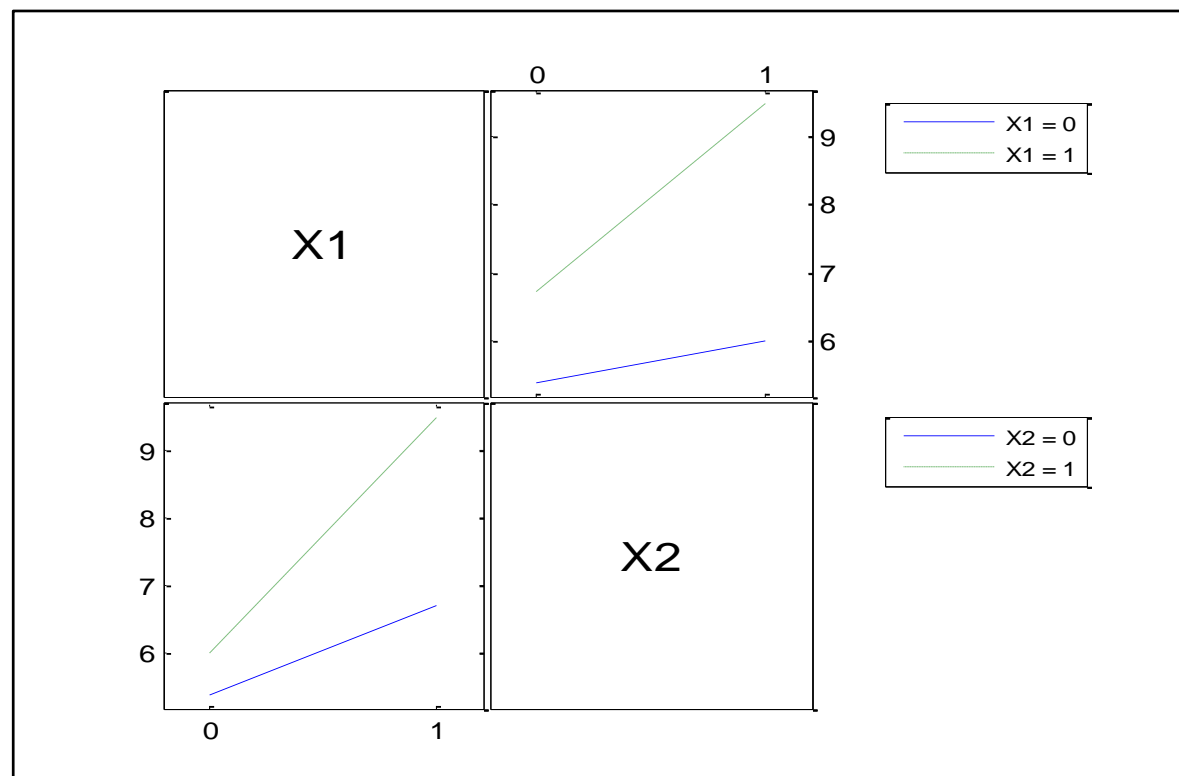


Figura 3.13: Gráfico de interacción *Nannochloropsis oculata*.

En la figura 3.13 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2

a) **Primer caso:**

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**



✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**

| | |
|----|----|
| +N | -P |
| +N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración alta de nitrógeno concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final sube de aproximadamente 6 a 9 ppm.

b) Segundo caso:

✓ **Fósforo constante en su nivel bajo (-P):**

| | |
|----|----|
| -P | -N |
| -P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración baja de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de polife aproximadamente de 5 a 6 ppm.

✓ **Fósforo constante en su nivel alto (+P):**

| | |
|----|----|
| +P | -N |
| +P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración alta de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de polife aproximadamente 6 a 9 ppm.

3.2.9. Resultados de la cuantificación de carotenoides en *Nannocylus oculata*



| | | | |
|---------|--------------------------------------|--------|---|
| | nitrógeno y fósforo. | | |
| G1 * G3 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.5269 | X |
| G2 * G3 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.6856 | X |

Tabla 3.30: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en *Nannochloropsis oculata*.

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|--|-------------------------------|--|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de carotenoides |
| G1 | Nitrógeno | 0.0007 | ✓ |
| G2 | Fósforo | < 0.001 | ✓ |
| G31 | Organización de medios de cultivo por columnas | 0.5989 | X |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 0.003 | ✓ |
| G1 * G31 | Interacción de nitrógeno y ubicación | 0.9627 | X |
| G2 * G31 | Interacción de fósforo y ubicación | 0.3371 | X |

Tabla 3.31: ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en *Nannochloropsis oculata*.

| ANÁLISIS DE LA VARIANZA | | | |
|-------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|--|
| Factores | Significado | Prob > p ($\alpha= 0.05$) | Influencia de factores sobre concentración de carotenoides |
| G1 | Nitrógeno | 2.55794e - 009 | ✓ |
| G2 | Fósforo | 1.36806e - 016 | ✓ |
| G1 * G2 | Interacción de nitrógeno y fósforo. | 6.40908e - 007 | ✓ |

Tabla 3.32: ANOVA entre nitrógeno y fósforo en *Nannochloropsis oculata*.

- ✓ **Gráfico de interacción entre nitrógeno y fósforo en la determinación de carotenoides en *Nannochloropsis oculata***

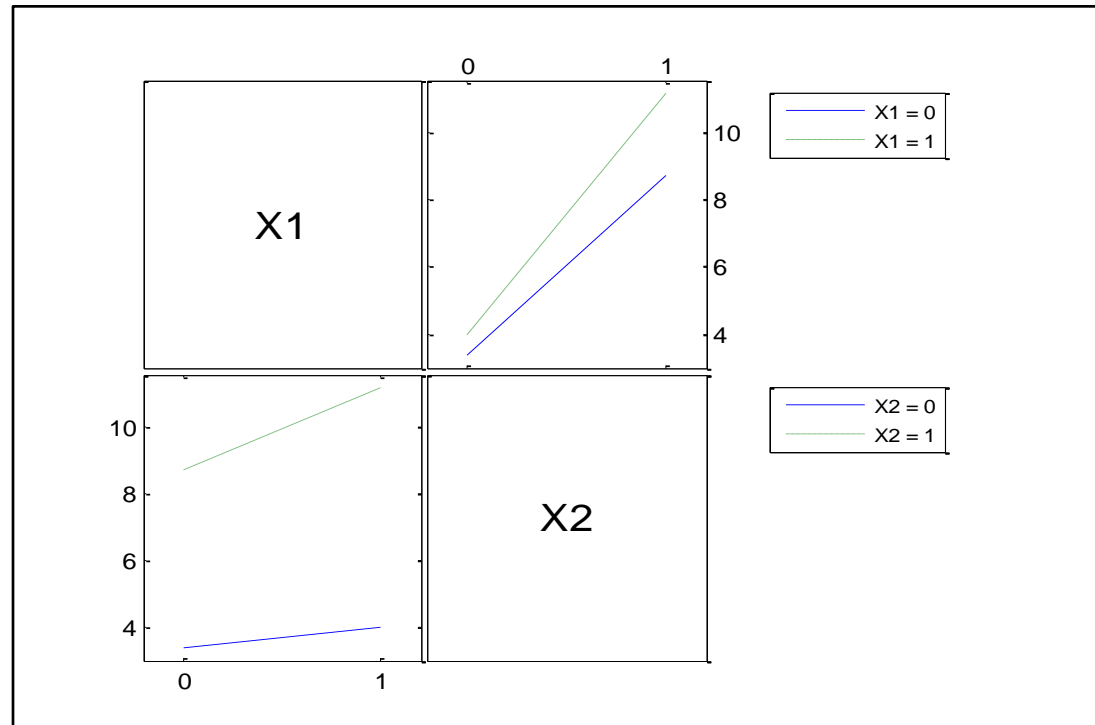


Figura 3.14: Gráfico de interacción *Nannochloropsis oculata*.

En la figura 3.14 se pueden observar dos casos correspondientes a X1 y X2

a) Primer caso:

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel bajo (-N):**

| | |
|----|----|
| -N | -P |
| -N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración baja de nitrógeno concentraciones de fósforo de nivel bajo a nivel alto la concentración final sube de aproximadamente 3 a 4 mg/mL.

- ✓ **Nitrógeno constante en su nivel alto (+N):**

| | |
|----|----|
| +N | -P |
| +N | +P |

Aparentemente al mantener la concentración alta de nitrógeno



| | |
|----|----|
| -P | +N |
|----|----|

Aparentemente al mantener la concentración baja de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de polife aproximadamente de 3 a 4 mg/mL.

✓ **Fósforo constante en su nivel alto (+P):**

| | |
|----|----|
| +P | -N |
| +P | +N |

Aparentemente al mantener la concentración alta de fósforo y variar las c de nitrógeno de nivel bajo a nivel alto, la concentración final de polife aproximadamente 8 a 11 mg/mL.

3.3. Discusión

Uno de los factores importantes en el crecimiento microalgal es el foto-p diferente para cada especie microalgal. En el presente estudio se enco crecimiento celular de *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata*, cuando se periodo de 14/10 y 10/14 horas luz/oscuridad respectivamente en compa cultivos expuestos a otros foto-periodos. Esto concuerda con las i realizadas por Fernández y colaboradores (2013), porque demuestran producción de biomasa en cultivos de *Chlorella sp.*, se obtuvo con el foto horas luz/oscuridad con una concentración de células por mililitro superior 15/9 y 18/6 horas luz/oscuridad en los cuales se presentó declinación ce punto de saturación de luz. En el caso de *Nannochloropsis ocul* colaboradores (2013), demuestran una mejora significativa en cuanto a la en periodos de oscuridad; es por ello que se encontró una mayor densidad el fotoperiodo 10/14 horas luz/oscuridad en el presente estudio.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

el magnesio forman parte de la clorofila, por lo tanto es el responsable de que las microalgas aparezcan de color verde y un exceso de nitrógeno se refleja en la coloración verde.

Partiendo de que el crecimiento y producción de metabolitos secundarios depende de la proporción y disponibilidad de los constituyentes bioquímicos de las microalgas, el nitrógeno y fósforo tal como lo demuestran Angulo y colaboradores (2010) determinaron que la escasa concentración de nitratos y fosfatos en los medios empleados, limitó la productividad de flavonoides, polifenoles y carotenoides en *Chlorella sp.* como de *Nannochloropsis oculata*, lo cual sugiere que a que a medida que el nitrógeno y fósforo disponibles se asimilan, cuando éstos se agotan, el crecimiento decrece ocasionando una menor productividad microalgal y en ocasiones la muerte celular.

En la segunda parte de este estudio, se muestra que la producción de metabolitos secundarios varió entre las dos especies estudiadas. Sin embargo, en los casos se generó mayor producción de metabolitos secundarios a altas concentraciones de nitrógeno y fósforo. Esto puede atribuirse a dos factores como son la especie de microalga y la concentración de nutrientes en el medio, de acuerdo con los estudios realizados por Gonzales (2010) en el cual demostró que la deficiencia de nitrógeno y fósforo tiene un efecto negativo en el crecimiento y por ende en la producción de sus metabolitos. Es así que la concentración de flavonoides alcanzada en los cultivos con alta concentración de nitrógeno en *Chlorella sp.* fue de 102,3 mg/mL, mientras que de *Nannochloropsis oculata* fue de 17,1 mg/mL, de igual manera sucede con la concentración de polifenoles y carotenoides, en la cual *Chlorella sp.* produce 12,1 ppm y 17,1 mg/mL respectivamente, mientras que *Nannochloropsis oculata* produce 9,4 ppm de polifenoles y 11,1 mg/mL de carotenoides. Resultando así *Chlorella sp.* como la microalga de mayor productividad.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

oculata presentó concentraciones de 33,1 y 3,3 mg/mL de flavonoides respectivamente. Respecto a la concentración de polifenoles, *Nannochloropsis oculata* presentó 5,4 ppm mientras que *Chlorella sp.* presentó 3,9 ppm. Esto indica que *Chlorella sp.* a pesar de las condiciones de estrés de nutrientes, produce más de flavonoides y carotenoides que *Nannochloropsis oculata*. Esto concuerda con estudios realizados por Tinoco y colaboradores (2016) en el cual indican que el estrés de nutrientes tiene un efecto negativo sobre *Nannochloropsis oculata* más que sobre *Chlorella sp.* Respecto a la concentración de polifenoles, al ser la variación de nutrientes en ambas microalgas no representa un punto favorable para *Nannochloropsis*

En la concentración de flavonoides y polifenoles tanto de *Chlorella* como de *Nannochloropsis oculata*, el nitrógeno es el que más influye en dicha concentración. Esto sugiere que el nitrógeno es el nutriente clave en los medios de cultivo ya que forma parte de la composición bioquímica de las microalgas, estimulando la producción de flavonoides y polifenoles. Respecto al fósforo, además de ser importante en la síntesis de metabolitos secundarios, se pudo demostrar su influencia predominante en la producción de carotenoides en las dos microalgas estudiadas, con lo cual se puede considerar como el mejor estimulador a la acumulación de lípidos neutros no polares y carotenoides.



CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES:

4.1. CONCLUSIONES:

- Con el fin de mejorar el crecimiento de las microalgas y por ende la producción de metabolitos secundarios a escala de laboratorio, se logró establecer el periodo óptimo para cada una de las especies cultivadas; siendo el periodo óptimo un periodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad para *Chlorella sp.* y día séptimo con un periodo de 10h de luz y 14h de oscuridad para *Nannochloropsis oculata*.
- Se logró comprobar el establecimiento adecuado de los parámetros dentro del diseño experimental propuesto, comprobándose que la orientación de los medios de cultivo de manera horizontal como vertical en el estante para el estudio de los mismos, no influyó en la concentración final de metabolitos secundarios, lo cual corrobora que la homogeneidad de condiciones al colocar los medios de cultivo en el estante fue correcta y los resultados obtenidos son significativos para estudios posteriores.
- El contenido de flavonoides, polifenoles y carotenoides de *Nannochloropsis oculata* se redujo significativamente en los medios con nitrógeno y fósforo limitados, mientras que en los medios con nitrógeno y fósforo, resultó en una elevación significativa del contenido de metabolitos secundarios estudiados, siendo en ambas especies el nitrógeno el nutriente que más limita la producción de flavonoides y polifenoles, y el fósforo el nutriente que más limita la producción de carotenoides. Este resultado no ha sido investigado en la literatura respecto al rol de estos elementos en



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

estrategia eficaz para optimizar el contenido de metabolitos s
Chlorella sp y *Nannochloropsis oculata*.

4.2. RECOMENDACIONES:

Se recomienda continuar el estudio, determinando la actividad antio
metabolitos investigados, con el objetivo de establecer una línea base
resulten posibles opciones viables de tratamiento. Así también determinar
los nutrientes nitrógeno y fósforo, sobre la síntesis de otros metabolito
presentes en *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata* con el objetiv
producción de las microalgas y por ende una mayor obtención de s
secundarios.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

BIBLIOGRAFÍA:

Acuario Méndez, S., & Arciniegas Solarte, K. (2015). *Evaluación de la Remoción de Nitratos en Muestras del Agua por Microalgas Clorofitas*. Recuperado el 03 de 2016, de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales GIRON - Te <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9407/1/UPS-QT07135.pdf>

Albuja Y, R., Araujo G, P., & López K., A. (Noviembre de 2011). *Obtención de un producto a partir del residuo ultra fino de Spirulina platensis, mediante degradación* (Ejército, Ed.) Recuperado el 03 de 10 de 2016, de Boletín Técnico de Ciencias de la vida. Sangolquí, <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5015/2/T-ESPE-033046-A>

Andersen, R., Berges, J., Harrison, P. J., & Watanabe, M. M. (2005). *Appendix Freshwater and Seawater Media*. Academic Press.

Angulo Mercado, E. R., Castellar Ortega, G. C., Morales Aredaño, E., & Barros Solís (de 2012). Remoción de azul de metileno por la microalga *Chlorella* *Atlántico*, 10(1), 53-60.

AST Ingeniería S.L. (Diciembre de 2013). *Aplicaciones de las microalgas: estado* Recuperado el 03 de Octubre de 2016, de <http://www.ast-ingenieria.com/>

Bastidas, O. (2013). *Conteo Celular con Hematocitómetro*. Recuperado el 10 de 05 de 2016, de *Elemental del He* <http://celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neuba>

Batista Gonzales, A., Charlie Marie, Mancin, J., & Vidal, A. (15 de Septiembre de 2014). *Remoción de metales pesados de aguas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes*. *Rev Cubana Plant M*

Bravo Rodríguez, M. L., & Jiménez Herráez, G. N. (2014). *Estimación del período de maduración de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos*. Obtenido de Universidad de Cuenca <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2458/1/tq1101.pdf>

Cabrera Cabrera, M. A., & Pulla Tenemaza, M. F. (Septiembre de 2014). *Linea*



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

- Catalá Esteve, L. (2013). *Contribución al estudio del crecimiento y las p aprovechamiento termoquímico de las microalgas Nannochlorops Nannochloropsis oculata*. Recuperado el 12 de Septiembre de 2016, de Universidad de https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/36415/1/tesis_catala_esteve.p
- Efrén, F. (2012). *Aislamiento y cultivo de microalgas para la extracción y caracteri grasos*. Recuperado el 07 de Septiembre de 2016, de Universidad <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/34983/1/castellanosgomezfer>
- FAO. (2016). *Cultivo de microalgas*. Recuperado el 12 de 10 de 2016, de Depósito de la FAO. Departamento de pesca y <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab473s/AB473S02.htm>
- Fernandez -Sevilla, J. M. (2014). *Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología*. Recuperado el 07 de Septiembre de 2016, de Universidad <http://www.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades nutrientes.html>
- García Cuadra, F., Jawiarczyk, N., González López, C. V., Fernández Sevilla, Fernández, F. G. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprox proteínas, carbohidratos y lípidos. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(2).
- García, A., & Flores, D. (2015-2016). *Caracterización del contenido y la carotenoides en frutos de nuevos híbridos de cítricos*. Recuperado el 15 de de Universidad https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/66323/TFGALEXANDRE%20DEVIS%20FLORES_14489077479685207796532016718424.pdf?sequence=
- Garibay , A., Vasquez, R., Sánchez , M., Serrano, L., & Martínez, A. (2009). Biod microalgas. *Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de* 13(3).
- Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León Tamariz, F. L., Cooman, L., & Muylaert, K. of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. (Agosto de 2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Producción de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Ciencias e Ingeniería*, 159-164.
- Jaramillo, J. (2008). *Chlorella* sp. Recuperado el 15 de Noviembre de 2016, de https://www.flickr.com/photos/juancamilojaramillo_ii/2249966423
- Jiménez Herráez, G. N., & Bravo Rodríguez, M. L. (2011). Estimación del período de vida útil de plantas medicinales en fundas de papel a través de la cuantificación de compuestos fenólicos. Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de Universidad de Cuenca: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2458>
- Leal, M., & Ortiz, N. (2001). Caracterización de la cianobacteria. *Boletín de Investigaciones Biológicas*, 35(3), 223 -372.
- León Tamariz, F. (2009). PNT microalgas. *Laboratorio de Plantas medicinales VLIR*.
- León, F. (Febrero de 2015). Procedimiento Normalizado para la Obtención de Biofertilizantes con Microalgas. *Laboratorio de microalgas*.
- Llopiz, A. (2016). Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas y sus aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista bionatura*, 1(2).
- López García, R. (2016). *Cuantificación de Polihidroxicarbohidratos en Cianobacterias de Agua Residual*. Recuperado el 12 de Agosto de 2016, de Escuela de Ingeniería de BarcelonaTECH.: http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/85084/TFG_RubenLo
- López, E., Fimbres, D., Medina, L., Baeza, M., Martínez, L., & Molina, D. (2013). Producción de biomasa y carotenoides de *Dunaliella tertiolecta* en medios limitados. *Revista internacional de botánica experimental*, 82(1), 23-30.
- Manahan, S. (2007). *Introducción a la Química Ambiental*. (M. d. Durán, Ed.) México: McGraw-Hill.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

- Otero, J. V., Herrarte Sánchez, A., & Medina Moral, E. (Enero de 2005). *Análisis de Varianza (ANOVA)*, 2005. Recuperado el 15 de Agosto de 2016, de https://www.uam.es/personal_pdi/economicas/eva/pdf/anova.pdf
- Pérez, E., & Carril, U. (2009). Fotosíntesis: Aspectos Básicos. *Reduca (Biología)*, 2(3), 1-10.
- Pérez, J. L. (12 de 2012). *La Estadística: Una Orquesta Hecha Instrumento*. Recuperado de 2016, de ANOVA Universidad de Cuenca <https://estadisticaorquestainstrumento.wordpress.com/2012/12/20/tema-1/>
- Quezada y Olgún . (2010). Las microalgas oleaginosas como fuente de bioenergía y otros productos: oportunidades. *Revista latinoamericana de biotecnología ambiental y agua*, 1(1), 1-10.
- Quintana, M. M., Hernández, L., Morris, H., & Fernández, M. (2001). Contenido de vitaminas en cultivos de *Chlorella* sp. *Rev. Cubana*, 1(13), 9-13.
- Rodríguez Amaya , D. (2000). Análisis de carotenoides. En o. d. Alimentación, *Procedimientos de datos de composición química de alimentos en nutrición*. Santiago, Chile: Editorial Quilmes.
- Roldán, G., & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de Limnología Neotropical* (Vol. 1). Universidad de Antioquia.
- Rolim. (2013). *Microalgae biophotonic optimization of photosynthesis by wavelength*. *WAVELENGTHS*. Recuperado el 23 de Junio de 2016, de Universidad de Sevilla https://getd.libs.uga.edu/pdfs/mattos_erico_r_201308_phd.pdf
- Romo Piñera, A. K. (2002). *Manuel para el cultivo de microalgas*. Recuperado el 15 de 2016, de Universidad Autónoma de Baja California Sur <http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>
- Ruiz. (2 de Noviembre de 2013). *Evaluación del enriquecimiento en lípidos de varias especies de microalgas*. Recuperado el 15 de Junio de 2016, de Universidad de Sevilla <http://rabida.uhu.es/dspace/handle/10272/8091>
- Sahabi, D., Shehu, R., Y., S., & A.S, A. (September de 2012). Screening for Total Carotenoids and Carotene in Some Widely Consumed Vegetables in Nigeria. *Nigerian Journal of Applied Science*, 20(3), 225-227.



UNIVERSIDAD DE CUENCA.

Schulze et al. (2014). Light emitting diodes (LEDs) applied to microalgal production

Sigma-Aldrich Co. LLC. (2016). *Guillard's (F/2) Marine Water Enrichment Solution*

24 de Septiembre de 2016

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g0154?lang=en&re>

Tinoco , N. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *C*
Nannocloropsis oculata under nitrogen starvation. *Latin American Jour*
Research, 44(2), 275-292.

Torres Degró, A. (2011). Tasas de crecimiento poblacional (r): Una mirada d
matemático lineal, geométrico y exponencial1. *CIDE digital, 142-160.*



ANEXOS

ANEXO A: Medios de cultivo para *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata*

ANEXO A-1: Medio de cultivo WC

SOLUCIÓN DE SALES INORGÁNICAS:

Soluciones stock de sales inorgánicas:

1. Preparar por separado y en la cantidad necesaria cada una de las soluciones, según la siguiente tabla.

| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) |
|---|--|
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 10.0 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 22.0 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 10.0 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 180.0 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 6.0 |

2. Colocar en frascos de polietileno de tapa rosca y etiquetar.
3. Almacenar en refrigeración. .

SOLUCIÓN DE VITAMINAS

Soluciones stock de vitaminas:



| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) |
|--------------------------------|--|
| Biotinina (Vitamina H) | 0.5 |
| CianocobalaminaB ₁₂ | 0.5 |

2. Filtrar y esterilizar al vacío y bajo campana.
3. Colocar en frascos de vidrio tapa rosca, etiquetar, almacenar en fuera del alcance de la luz.

Solución stock WC:

1. Preparar por separado y en la cantidad necesaria cada una de soluciones, según la siguiente tabla.

| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) |
|---|--|
| NaNO ₃ | 85.01 |
| Ca Cl ₂ ·2H ₂ O | 36.76 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 36.97 |
| NaHCO ₃ | 12.60 |
| Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O | 28.42 |
| K ₂ HPO ₄ | 8.71 |

2. Colocar en frascos de vidrio tapa rosca, etiquetar y almacenar ambiente (León Tamariz, 2009).



Solución stock

Para preparar, comenzar con 950 mL de agua destilada y añadir los componentes. El oligoelemento y soluciones de vitaminas se agregan por separado. Llevar el volumen final a 1 litro con agua destilada. Autoclavar.

| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) | Cantidad usada | Concentración en el medio (M) |
|---|---|----------------|-------------------------------|
| NaNO ₃ | 75 | 1 mL | 8.83 x 10 ⁻⁴ M |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 5 | 1 mL | 3.63 x 10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O* | 30 | 1 mL | 1.07 x 10 ⁻⁴ M |
| Solución traza de metales f/2 | | 1 mL | - |
| Solución de vitaminas f/2 | | 0.5 mL | - |

Para preparar 500 mL de medio de cultivo se utilizó la mitad de la cantidad de componentes.

Solución de sales inorgánicas para medio F/2

En 950 mL de agua, se disuelve el EDTA y otros componentes. Llevar el volumen final a 1 litro con agua.

| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) | Cantidad usada | Concentración en el medio (M) |
|--|---|----------------|-------------------------------|
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | - | 3.15 g | 1 x 10 ⁻⁵ M |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | - | 4.36 g | 1 x 10 ⁻⁵ M |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 180 | 1 mL | 9 x 10 ⁻⁷ M |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 22 | 1 mL | 8 x 10 ⁻⁸ M |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 10 | 1 mL | 5 x 10 ⁻⁸ M |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 9.8 | 1 mL | 4 x 10 ⁻⁸ M |



Solución de vitamina F/2

En 950 mL de agua, disolver la tiamina. **HCl**, y añadir 1 mL de las acciones ajusta el volumen final a 1 litro con agua destilada. Filtrar y almacenar en el

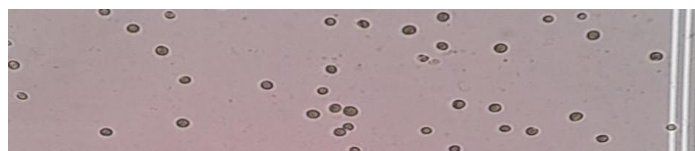
| Componente | Solución stock (g* L ⁻¹ dH ₂ O) | Concentración molar en el medio | Ca us |
|-----------------------------------|--|------------------------------------|----------|
| Tiamina · HCl | - | 2.96×10^{-7} M | 200 |
| Biotina (Vitamina H) | 1.0 | 2.05×10^{-9} M | 1 m |
| Vitamina B12 (cianocobalamina) | 1.0 | 3.69×10^{-10} M | 1 |

La solución de vitamina se adiciona bajo cabina

ANEXO B: Acondicionamiento y observación de los cultivos de microa



Estante acondicionado para el cultivo de *Chlorella sp* y *Nannochloropsis oculata*





UNIVERSIDAD DE CUENCA.



Células de *Nannochloropsis oculata*; Fresco; 40X; D. Lucero; CAMARA BENQ 10

ANEXO C: Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Disolver 10g de Tungstato de sodio y 2,5g de Molibdato de sodio en 70 mL de agua destilada. Añadir 5 mL de ácido fosfórico al 85% y 10 mL de HCl concentrado. Refrigerar durante 24 horas. Agregar 15g de Sulfato de litio, 5 mL de agua y una gota de Bromo. Refrigerar durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a 100mL con agua destilada (Rodríguez & Jiménez Herráez, 2014).



**ANEXO D: Recuento celular de *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata* en cámara de Neubauer.**

| N° de estante | Tiempo de exposicion a luz | Temperatura (°C) | N° de balon | DIAS | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------------|------------------|-------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 13 |
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | 1.623.333,33 | 4.660.000,00 | 6.450.000,00 | 15.523.333,33 | 16.593.333,33 | 18.436.666,67 | 20.976.666,67 | 21.506.666,67 | 20.813.333,33 | 19.293.333,33 |
| | | | 2 | 2.323.333,33 | 4.476.666,67 | 7.756.666,67 | 15.700.000,00 | 16.663.333,33 | 16.506.666,67 | 15.200.000,00 | 14.220.000,00 | 15.273.333,33 | 15.553.333,33 |
| | | | 3 | 1.933.333,33 | 4.793.333,33 | 6.776.666,67 | 15.943.333,33 | 17.986.666,67 | 19.850.000,00 | 20.936.666,67 | 21.113.333,33 | 20.106.666,67 | 20.053.333,33 |
| | | | 4 | 2.350.000,00 | 5.336.666,67 | 6.580.000,00 | 15.543.333,33 | 12.920.000,00 | 11.613.333,33 | 13.416.666,67 | 12.436.666,67 | 8.693.333,33 | 12.140.000,00 |
| Estante 2 | 12 | 34-37 | 5 | 3.200.000,00 | 5.990.000,00 | 9.120.000,00 | 18.780.000,00 | 17.953.333,33 | 20.180.000,00 | 21.586.666,67 | 20.876.666,67 | 18.866.666,67 | 18.906.666,67 |
| | | | 6 | 3.313.333,33 | 7.220.000,00 | 9.553.333,33 | 12.626.666,67 | 13.280.000,00 | 12.620.000,00 | 13.043.333,33 | 11.296.666,67 | 9.986.666,67 | 5.126.666,67 |
| | | | 7 | 3.396.666,67 | 6.880.000,00 | 9.206.666,67 | 21.500.000,00 | 19.636.666,67 | 22.826.666,67 | 24.956.666,67 | 27.200.000,00 | 26.646.666,67 | 22.740.000,00 |
| | | | 8 | 3.266.666,67 | 8.533.333,33 | 9.453.333,33 | 13.706.666,67 | 15.830.000,00 | 12.506.666,67 | 13.830.000,00 | 12.293.333,33 | 14.953.333,33 | 12.653.333,33 |
| Estante 3 | 14 | 33-35 | 9 | 4.576.666,67 | 11.156.666,67 | 13.913.333,33 | 25.980.000,00 | 21.226.666,67 | 25.193.333,33 | 28.906.666,67 | 26.966.666,67 | 24.826.666,67 | 24.626.666,67 |
| | | | 10 | 2.970.000,00 | 11.336.666,67 | 12.620.000,00 | 13.416.666,67 | 14.156.666,67 | 12.303.333,33 | 15.113.333,33 | 14.490.000,00 | 13.020.000,00 | 11.846.666,67 |
| | | | 11 | 4.503.333,33 | 12.863.333,33 | 13.260.000,00 | 16.120.000,00 | 17.070.000,00 | 20.706.666,67 | 22.550.000,00 | 20.890.000,00 | 19.646.666,67 | 18.373.333,33 |
| | | | 12 | 4.063.333,33 | 11.150.000,00 | 12.343.333,33 | 14.300.000,00 | 14.163.333,33 | 14.356.666,67 | 13.653.333,33 | 12.250.000,00 | 11.626.666,67 | 14.160.000,00 |
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | 3.653.333,33 | 13.326.666,67 | 12.363.333,33 | 14.083.333,33 | 14.040.000,00 | 12.853.333,33 | 12.513.333,33 | 10.863.333,33 | 9.100.000,00 | 9.260.000,00 |
| | | | 14 | 4.773.333,33 | 13.146.666,67 | 15.380.000,00 | 14.830.000,00 | 14.793.333,33 | 13.883.333,33 | 13.570.000,00 | 12.113.333,33 | 14.253.333,33 | 12.420.000,00 |
| | | | 15 | 3.560.000,00 | 13.853.333,33 | 12.673.333,33 | 13.783.333,33 | 14.043.333,33 | 12.466.666,67 | 11.173.333,33 | 12.680.000,00 | 11.100.000,00 | 10.466.666,67 |
| | | | 16 | 4.520.000,00 | 13.570.000,00 | 15.660.000,00 | 16.820.000,00 | 15.726.666,67 | 13.576.666,67 | 15.306.666,67 | 19.580.000,00 | 19.320.000,00 | 17.386.666,67 |

Resultados del recuento celular de *Chlorella sp.* en cámara de Neubauer.



| N° de estante | Tiempo de exposicion a luz | Temperatura (°C) | N° de balon | DIAS | | | | | | | | | | | | |
|---------------|----------------------------|------------------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--|--|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 13 | | |
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | 7.233.333,33 | 8.710.000,00 | 11.310.000,00 | 11.566.666,67 | 15.180.000,00 | 15.096.666,67 | 15.873.333,33 | 14.123.333,33 | 12.893.333,33 | 10.450.000,00 | 7.653.333,33 | | |
| | | | 2 | 7.803.333,33 | 9.453.333,33 | 10.830.000,00 | 11.583.333,33 | 14.673.333,33 | 15.716.666,67 | 17.050.000,00 | 14.363.333,33 | 12.813.333,33 | 10.203.333,33 | 7.700.000,00 | | |
| | | | 3 | 7.550.000,00 | 9.123.333,33 | 11.233.333,33 | 11.800.000,00 | 14.800.000,00 | 15.346.666,67 | 16.003.333,33 | 14.216.666,67 | 12.733.333,33 | 9.613.333,33 | 7.140.000,00 | | |
| | | | 4 | 7.960.000,00 | 9.363.333,33 | 11.003.333,33 | 10.506.666,67 | 16.180.000,00 | 15.776.666,67 | 16.816.666,67 | 14.130.000,00 | 12.720.000,00 | 10.246.666,67 | 7.543.333,33 | | |
| Estante 2 | 12 | 34-37 | 5 | 8.433.333,33 | 9.736.666,67 | 10.426.666,67 | 11.723.333,33 | 13.773.333,33 | 15.263.333,33 | 11.643.333,33 | 10.206.666,67 | 8.980.000,00 | 7.780.000,00 | 6.310.000,00 | | |
| | | | 6 | 8.160.000,00 | 10.176.666,67 | 10.516.666,67 | 12.830.000,00 | 14.940.000,00 | 15.913.333,33 | 12.316.666,67 | 10.403.333,33 | 9.190.000,00 | 8.140.000,00 | 6.003.333,33 | | |
| | | | 7 | 7.663.333,33 | 9.680.000,00 | 11.316.666,67 | 12.146.666,67 | 14.110.000,00 | 15.206.666,67 | 12.026.666,67 | 9.846.666,67 | 9.000.000,00 | 7.670.000,00 | 5.970.000,00 | | |
| | | | 8 | 8.870.000,00 | 10.266.666,67 | 10.886.666,67 | 12.606.666,67 | 14.756.666,67 | 15.193.333,33 | 12.526.666,67 | 10.773.333,33 | 9.066.666,67 | 7.890.000,00 | 6.323.333,33 | | |
| Estante 3 | 14 | 33-35 | 9 | 11.176.666,67 | 12.173.333,33 | 10.316.666,67 | 11.993.333,33 | 15.176.666,67 | 14.550.000,00 | 11.733.333,33 | 9.870.000,00 | 7.736.666,67 | 7.160.000,00 | 5.590.000,00 | | |
| | | | 10 | 11.713.333,33 | 11.460.000,00 | 11.746.666,67 | 12.596.666,67 | 14.713.333,33 | 15.346.666,67 | 12.216.666,67 | 9.596.666,67 | 8.193.333,33 | 7.233.333,33 | 5.630.000,00 | | |
| | | | 11 | 11.786.666,67 | 12.250.000,00 | 11.063.333,33 | 12.376.666,67 | 14.916.666,67 | 15.160.000,00 | 11.883.333,33 | 9.326.666,67 | 7.823.333,33 | 7.006.666,67 | 5.653.333,33 | | |
| | | | 12 | 11.273.333,33 | 12.606.666,67 | 11.740.000,00 | 11.933.333,33 | 15.103.333,33 | 14.666.666,67 | 12.150.000,00 | 9.523.333,33 | 7.896.666,67 | 6.673.333,33 | 5.673.333,33 | | |
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | 8.740.000,00 | 11.776.666,67 | 10.750.000,00 | 13.393.333,33 | 14.880.000,00 | 13.856.666,67 | 12.640.000,00 | 9.173.333,33 | 9.143.333,33 | 7.203.333,33 | 5.506.666,67 | | |
| | | | 14 | 8.893.333,33 | 11.116.666,67 | 12.310.000,00 | 12.773.333,33 | 15.503.333,33 | 13.183.333,33 | 12.416.666,67 | 9.350.000,00 | 8.636.666,67 | 7.520.000,00 | 5.556.666,67 | | |
| | | | 15 | 9.233.333,33 | 11.480.000,00 | 11.720.000,00 | 11.956.666,67 | 14.380.000,00 | 13.533.333,33 | 11.710.000,00 | 9.283.333,33 | 9.290.000,00 | 7.476.666,67 | 5.680.000,00 | | |
| | | | 16 | 10.796.666,67 | 11.480.000,00 | 12.530.000,00 | 12.210.000,00 | 14.433.333,33 | 13.350.000,00 | 12.390.000,00 | 8.826.666,67 | 8.890.000,00 | 6.800.000,00 | 5.553.333,33 | | |

Resultados del recuento celular de *Nannochloropsis oculata* en cámara de Neubauer.

**ANEXO E: Determinación de la tasa de crecimiento geométrico para *Chlorella sp.* y *Nannochloropsis oculata*.**

| N° de estante | Tiempo de exposicion a luz | Temperatura (°C) | N° de balon | CALCULO DE LA TASA DE CRECIMIENTO | | | | | | | | |
|---------------|----------------------------|------------------|-------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | 1,87 | 0,38 | 0,34 | 0,07 | 0,11 | 0,14 | 0,03 | -0,03 | -0,04 |
| | | | 2 | 0,93 | 0,73 | 0,26 | 0,06 | -0,01 | -0,08 | -0,06 | 0,07 | 0,01 |
| | | | 3 | 1,48 | 0,41 | 0,33 | 0,13 | 0,10 | 0,05 | 0,01 | -0,05 | 0,00 |
| | | | 4 | 1,27 | 0,23 | 0,33 | -0,17 | -0,10 | 0,16 | -0,07 | -0,30 | 0,18 |
| Estante 2 | 12 | 34-37 | 5 | 0,87 | 0,52 | 0,27 | -0,04 | 0,12 | 0,07 | -0,03 | -0,10 | 0,00 |
| | | | 6 | 1,18 | 0,32 | 0,10 | 0,05 | -0,05 | 0,03 | -0,13 | -0,12 | -0,28 |
| | | | 7 | 1,03 | 0,34 | 0,33 | -0,09 | 0,16 | 0,09 | 0,09 | -0,02 | -0,08 |
| | | | 8 | 1,61 | 0,11 | 0,13 | 0,15 | -0,21 | 0,11 | -0,11 | 0,22 | -0,08 |
| Estante 3 | 14 | 33-35 | 9 | 1,44 | 0,25 | 0,23 | -0,18 | 0,19 | 0,15 | -0,07 | -0,08 | 0,00 |
| | | | 10 | 2,82 | 0,11 | 0,02 | 0,06 | -0,13 | 0,23 | -0,04 | -0,10 | -0,05 |
| | | | 11 | 1,86 | 0,03 | 0,07 | 0,06 | 0,21 | 0,09 | -0,07 | -0,06 | -0,03 |
| | | | 12 | 1,74 | 0,11 | 0,05 | -0,01 | 0,01 | -0,05 | -0,10 | -0,05 | 0,10 |
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | 2,65 | -0,07 | 0,04 | 0,00 | -0,08 | -0,03 | -0,13 | -0,16 | 0,01 |
| | | | 14 | 1,75 | 0,17 | -0,01 | 0,00 | -0,06 | -0,02 | -0,11 | 0,18 | -0,07 |
| | | | 15 | 2,89 | -0,09 | 0,03 | 0,02 | -0,11 | -0,10 | 0,13 | -0,12 | -0,03 |
| | | | 16 | 2,00 | 0,15 | 0,02 | -0,07 | -0,14 | 0,13 | 0,28 | -0,01 | -0,05 |

Cálculo de la tasa de crecimiento de *Chlorella sp.*



| N° de estante | Tiempo de exposición a luz artificial (hrs) | Temperatura (°C) | N° de balón | CALCULO DE LA TASA DE CRECIMIENTO | | | | | | | | | | |
|---------------|---|------------------|-------------|-----------------------------------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| Estante 1 | 10 | 33-35 | 1 | 0,20 | 0,30 | 0,02 | 0,15 | -0,01 | 0,05 | -0,11 | -0,09 | -0,19 | -0,14 | |
| | | | 2 | 0,21 | 0,15 | 0,07 | 0,13 | 0,07 | 0,08 | -0,16 | -0,11 | -0,20 | -0,13 | |
| | | | 3 | 0,21 | 0,23 | 0,05 | 0,12 | 0,04 | 0,04 | -0,11 | -0,10 | -0,25 | -0,14 | |
| | | | 4 | 0,18 | 0,18 | -0,05 | 0,24 | -0,02 | 0,07 | -0,16 | -0,10 | -0,19 | -0,14 | |
| Estante 2 | 12 | 34-37 | 5 | 0,15 | 0,07 | 0,12 | 0,08 | 0,11 | -0,24 | -0,12 | -0,12 | -0,13 | -0,10 | |
| | | | 6 | 0,25 | 0,03 | 0,22 | 0,08 | 0,07 | -0,23 | -0,16 | -0,12 | -0,11 | -0,14 | |
| | | | 7 | 0,26 | 0,17 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | -0,21 | -0,18 | -0,09 | -0,15 | -0,12 | |
| | | | 8 | 0,16 | 0,06 | 0,16 | 0,08 | 0,03 | -0,18 | -0,14 | -0,16 | -0,13 | -0,10 | |
| Estante 3 | 14 | 33-35 | 9 | 0,09 | -0,15 | 0,16 | 0,12 | -0,04 | -0,19 | -0,16 | -0,22 | -0,07 | -0,12 | |
| | | | 10 | -0,02 | 0,03 | 0,07 | 0,08 | 0,04 | -0,20 | -0,21 | -0,15 | -0,12 | -0,12 | |
| | | | 11 | 0,04 | -0,10 | 0,12 | 0,10 | 0,02 | -0,22 | -0,22 | -0,16 | -0,10 | -0,10 | |
| | | | 12 | 0,12 | -0,07 | 0,02 | 0,13 | -0,03 | -0,17 | -0,22 | -0,17 | -0,15 | -0,08 | |
| Estante 4 | 16 | 34-37 | 13 | 0,35 | -0,09 | 0,25 | 0,05 | -0,07 | -0,09 | -0,27 | 0,00 | -0,21 | -0,13 | |
| | | | 14 | 0,25 | 0,11 | 0,04 | 0,10 | -0,15 | -0,06 | -0,25 | -0,08 | -0,13 | -0,14 | |
| | | | 15 | 0,24 | 0,02 | 0,02 | 0,10 | -0,06 | -0,13 | -0,21 | 0,00 | -0,20 | -0,13 | |
| | | | 16 | 0,06 | 0,09 | -0,03 | 0,09 | -0,08 | -0,07 | -0,29 | 0,01 | -0,24 | -0,10 | |

Cálculo de la tasa de crecimiento de *Nannochloropsis oculata*.

**ANEXO F: Comandos y resultados en Matlab**

Comando en matlab para ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de flavonoides en *Chlorella sp.*

```
[pi,tbli,statsi,termsi]=anovan(Y,{G1,G2,G3},'model','interaction','varnames',{'G1','G2','G3'})
```

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 6027.6 | 1 | 6027.58 | 353.01 | 0.0003 |
| G2 | 2742.4 | 1 | 2742.36 | 160.61 | 0.0011 |
| G3 | 5 | 3 | 1.66 | 0.1 | 0.9563 |
| G1*G2 | 2096.5 | 1 | 2096.5 | 122.78 | 0.0016 |
| G1*G3 | 9.6 | 3 | 3.2 | 0.19 | 0.8986 |
| G2*G3 | 14 | 3 | 4.68 | 0.27 | 0.842 |
| Error | 51.2 | 3 | 17.07 | | |
| Total | 10946.3 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de tres vías en *Chlorella sp.*

Comando en matlab para ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de flavonoides en *Chlorella sp.*

```
[pi,tbli,statsi,termsi]=anovan(Y,{G1,G2,G31},'model','interaction','varnames',{'G1','G2','G31'})
```

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|---------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 6027.6 | 1 | 6027.58 | 1269.44 | 0 |
| G2 | 2742.4 | 1 | 2742.36 | 577.56 | 0.0002 |
| G31 | 22.5 | 3 | 7.52 | 1.58 | 0.3576 |
| G1*G2 | 2096.5 | 1 | 2096.5 | 441.53 | 0.0002 |
| G1*G31 | 32.2 | 3 | 10.73 | 2.26 | 0.2601 |
| G2*G31 | 10.9 | 3 | 3.63 | 0.76 | 0.5851 |
| Error | 14.2 | 3 | 4.75 | | |
| Total | 10946.3 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Chlorella sp.*



Comando en matlab para ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de flavonoides en *Chlorella sp.*

```
[pif,tblif,statsif,termsif]=anovan(Y,{G1,G2},'model','interaction','varnames',{'G1','G2'})
```

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 6027.6 | 1 | 6027.58 | 905.58 | 1.13498e-012 |
| G2 | 2742.4 | 1 | 2742.36 | 412.01 | 1.1735e-010 |
| G1*G2 | 2096.5 | 1 | 2096.5 | 314.98 | 5.6008e-010 |
| Error | 79.9 | 12 | 6.66 | | |
| Total | 10946.3 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Chlorella sp.*

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de polifenoles en *Chlorella sp.*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|---------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 113.103 | 1 | 113.103 | 4112.84 | 0 |
| G2 | 33.524 | 1 | 33.524 | 1219.06 | 0.0001 |
| G3 | 0.078 | 3 | 0.026 | 0.94 | 0.5192 |
| G1*G2 | 3.497 | 1 | 3.497 | 127.16 | 0.0015 |
| G1*G3 | 0.006 | 3 | 0.002 | 0.07 | 0.9701 |
| G2*G3 | 0.049 | 3 | 0.016 | 0.59 | 0.661 |
| Error | 0.083 | 3 | 0.028 | | |
| Total | 150.339 | 15 | | | |

Tabla 0.1: Análisis de la varianza *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de polifenoles en *Chlorella sp.*



| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|------|----------|----------|--------|
| Source | Sum Sq. | d.f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 113.103 | 1 | 113.103 | 15529.05 | 0 |
| G2 | 33.524 | 1 | 33.524 | 4602.85 | 0 |
| G31 | 0.071 | 3 | 0.024 | 3.25 | 0.1797 |
| G1*G2 | 3.497 | 1 | 3.497 | 480.12 | 0.0002 |
| G1*G31 | 0.111 | 3 | 0.037 | 5.06 | 0.1079 |
| G2*G31 | 0.012 | 3 | 0.004 | 0.54 | 0.6884 |
| Error | 0.022 | 3 | 0.007 | | |
| Total | 150.339 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Chlorella sp.*

Resultados de ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de polifenoles en *Chlorella sp.*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|------|----------|---------|--------------|
| Source | Sum Sq. | d.f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 113.103 | 1 | 113.103 | 6308.34 | 1.05758e-017 |
| G2 | 33.524 | 1 | 33.524 | 1869.81 | 1.52103e-014 |
| G1*G2 | 3.497 | 1 | 3.497 | 195.04 | 8.77307e-009 |
| Error | 0.215 | 12 | 0.018 | | |
| Total | 150.339 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Chlorella sp.*



Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de carotenoides en *Chlorella sp.*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d.f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 45.63 | 1 | 45.63 | 32.95 | 0.0105 |
| G2 | 196.14 | 1 | 196.14 | 141.64 | 0.0013 |
| G3 | 0.589 | 3 | 0.196 | 0.14 | 0.9285 |
| G1*G2 | 18.879 | 1 | 18.879 | 13.63 | 0.0345 |
| G1*G3 | 0.489 | 3 | 0.163 | 0.12 | 0.9439 |
| G2*G3 | 2.93 | 3 | 0.977 | 0.71 | 0.6094 |
| Error | 4.154 | 3 | 1.385 | | |
| Total | 268.812 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de tres vías en *Chlorella sp.*

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de carotenoides en *Chlorella sp.*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d.f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 45.63 | 1 | 45.63 | 38.87 | 0.0083 |
| G2 | 196.14 | 1 | 196.14 | 167.09 | 0.001 |
| G31 | 0.606 | 3 | 0.202 | 0.17 | 0.9089 |
| G1*G2 | 18.879 | 1 | 18.879 | 16.08 | 0.0278 |
| G1*G31 | 2.514 | 3 | 0.838 | 0.71 | 0.6058 |
| G2*G31 | 1.522 | 3 | 0.507 | 0.43 | 0.7457 |
| Error | 3.522 | 3 | 1.174 | | |
| Total | 268.812 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Chlorella sp.*

Resultados de ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de carotenoides en *Chlorella sp.*



| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 45.63 | 1 | 45.63 | 67.08 | 0 |
| G2 | 196.14 | 1 | 196.14 | 288.35 | 0 |
| G1*G2 | 18.879 | 1 | 18.879 | 27.75 | 0.0002 |
| Error | 8.162 | 12 | 0.68 | | |
| Total | 268.812 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Chlorella sp.*

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de flavonoides en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 1821.37 | 1 | 1821.37 | 185.59 | 0.0009 |
| G2 | 633.91 | 1 | 633.91 | 64.59 | 0.004 |
| G3 | 36.61 | 3 | 12.2 | 1.24 | 0.431 |
| G1*G2 | 407.33 | 1 | 407.33 | 41.51 | 0.0076 |
| G1*G3 | 1.86 | 3 | 0.62 | 0.06 | 0.9758 |
| G2*G3 | 17.95 | 3 | 5.98 | 0.61 | 0.6529 |
| Error | 29.44 | 3 | 9.81 | | |
| Total | 2948.47 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de tres vías en *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de flavonoides en *Nannochloropsis oculata*



| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|-------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 1821.37 | 1 | 1821.37 | 280.4 | 0.0005 |
| G2 | 633.91 | 1 | 633.91 | 97.59 | 0.0022 |
| G31 | 15.91 | 3 | 5.3 | 0.82 | 0.5641 |
| G1*G2 | 407.33 | 1 | 407.33 | 62.71 | 0.0042 |
| G1*G31 | 19.47 | 3 | 6.49 | 1 | 0.5003 |
| G2*G31 | 31 | 3 | 10.33 | 1.59 | 0.3561 |
| Error | 19.49 | 3 | 6.5 | | |
| Total | 2948.47 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de flavonoides en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 1821.37 | 1 | 1821.37 | 254.54 | 1.91579e-009 |
| G2 | 633.91 | 1 | 633.91 | 88.59 | 6.86308e-007 |
| G1*G2 | 407.33 | 1 | 407.33 | 56.93 | 6.81217e-006 |
| Error | 85.87 | 12 | 7.16 | | |
| Total | 2948.47 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Nannochloropsis oculata*.



Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de polifenoles en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 22.8245 | 1 | 22.8245 | 153.92 | 0.0011 |
| G2 | 11.3401 | 1 | 11.3401 | 76.47 | 0.0031 |
| G3 | 0.1211 | 3 | 0.0404 | 0.27 | 0.8432 |
| G1*G2 | 4.5903 | 1 | 4.5903 | 30.96 | 0.0115 |
| G1*G3 | 0.224 | 3 | 0.0747 | 0.5 | 0.7064 |
| G2*G3 | 0.2468 | 3 | 0.0823 | 0.55 | 0.6798 |
| Error | 0.4449 | 3 | 0.1483 | | |
| Total | 39.7916 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de tres vías en *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de polifenoles en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 22.8245 | 1 | 22.8245 | 416.71 | 0.0003 |
| G2 | 11.3401 | 1 | 11.3401 | 207.04 | 0.0007 |
| G31 | 0.2368 | 3 | 0.0789 | 1.44 | 0.3856 |
| G1*G2 | 4.5903 | 1 | 4.5903 | 83.81 | 0.0028 |
| G1*G31 | 0.4181 | 3 | 0.1394 | 2.54 | 0.2316 |
| G2*G31 | 0.2176 | 3 | 0.0725 | 1.32 | 0.4115 |
| Error | 0.1643 | 3 | 0.0548 | | |
| Total | 39.7916 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Nannochloropsis oculata*.



Resultados de ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de polifenoles en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|--------|--------------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 22.8245 | 1 | 22.8245 | 264.18 | 1.54705e-009 |
| G2 | 11.3401 | 1 | 11.3401 | 131.25 | 8.09025e-008 |
| G1*G2 | 4.5903 | 1 | 4.5903 | 53.13 | 9.61969e-006 |
| Error | 1.0368 | 12 | 0.0864 | | |
| Total | 39.7916 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por filas en la determinación de carotenoides en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|---------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 9.257 | 1 | 9.257 | 273.01 | 0.0005 |
| G2 | 157.314 | 1 | 157.314 | 4639.68 | 0 |
| G3 | 0.208 | 3 | 0.069 | 2.05 | 0.2853 |
| G1*G2 | 3.432 | 1 | 3.432 | 101.21 | 0.0021 |
| G1*G3 | 0.093 | 3 | 0.031 | 0.92 | 0.5269 |
| G2*G3 | 0.055 | 3 | 0.018 | 0.54 | 0.6856 |
| Error | 0.102 | 3 | 0.034 | | |
| Total | 170.462 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de tres vías en *Nannochloropsis oculata*.



Resultados de ANOVA entre nitrógeno, fósforo y ubicación de medios de cultivo por columnas en la determinación de carotenoides en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|---------|--------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 9.257 | 1 | 9.257 | 212.69 | 0.0007 |
| G2 | 157.314 | 1 | 157.314 | 3614.52 | 0 |
| G31 | 0.095 | 3 | 0.032 | 0.73 | 0.5989 |
| G1*G2 | 3.432 | 1 | 3.432 | 78.85 | 0.003 |
| G1*G31 | 0.011 | 3 | 0.004 | 0.09 | 0.9627 |
| G2*G31 | 0.222 | 3 | 0.074 | 1.7 | 0.3371 |
| Error | 0.131 | 3 | 0.044 | | |
| Total | 170.462 | 15 | | | |

Análisis de la varianza *Nannochloropsis oculata*.

Resultados de ANOVA entre nitrógeno y fósforo en la determinación de carotenoides en *Nannochloropsis oculata*

| Analysis of Variance | | | | | |
|----------------------|---------|-------|----------|---------|--------------|
| Source | Sum Sq. | d. f. | Mean Sq. | F | Prob>F |
| G1 | 9.257 | 1 | 9.257 | 242.05 | 2.55794e-009 |
| G2 | 157.314 | 1 | 157.314 | 4113.46 | 1.36806e-016 |
| G1*G2 | 3.432 | 1 | 3.432 | 89.73 | 6.40908e-007 |
| Error | 0.459 | 12 | 0.038 | | |
| Total | 170.462 | 15 | | | |

Análisis de la varianza de dos vías *Nannochloropsis oculata*.