UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE EL GIRÓN
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS DE LA OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO ARTESANAL PARA LA PRODUCCIÓN DE FICOCIANINA A PARTIR DE *Arthrospira platensis.*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: KIMBERLY SUSANA CASTRO REYES

TUTOR: DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA

Quito - Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Castro Reyes Kimberly Susana con documento de identificación N° 0150105642 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 07 de agosto del 2023

Atentamente,

Castro Reyes Kimberly Susana
0150105641

CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Castro Reyes Kimberly Susana con documento de identificación No. 0150105641, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: "Análisis de la optimización de un medio de cultivo artesanal para la producción de ficocianina a partir de *Arthrospira platensis"*, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de agosto del 2023

Atentamente,

Castro Reyes Kimberly Susana
0150105641

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Daniel Alberto Freire Balseca con documento de identificación N° 1720534468, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: ANÁLISIS DE LA OPTIMIZACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO ARTESANAL PARA LA PRODUCCIÓN DE FICOCIANINA A PARTIR DE *Arthrospira platensis* realizado por Castro Reyes Kimberly Susana con documento de identificación N° 0150105641, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 07 de agosto del 2023

Atentamente,

Ing. Daniel Alberto Freire Balseca, Msc

1720534468

DEDICATORIA

En primer lugar, deseo dedicar el presente trabajo de titulación a Dios, quien ha sido mi guía durante esta travesía académica y en la vida. Tengo una gratitud infinita por su presencia en mi vida y su amor incondicional. Agradezco profundamente a Dios por su amor y por otorgarme incontables bendiciones para alcanzar este logro. A mis padres, quienes con su sacrificio y trabajo arduo han sido un ejemplo de constante valentía y perseverancia. Su amor incondicional y su confianza en mí son un tesoro invaluable en mi corazón. A mi hermana Evelyn Castro, quien ha sido mi mayor inspiración, siempre motivándome a dar lo mejor de mí, y por su apoyo incondicional y palabras de aliento en momentos de dificultad.

Kimberly Susana Castro Reyes

AGRADECIMIENTOS

Al haber culminado esta etapa especial de mi vida, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a Dios por su guía y fortaleza durante todo este camino, que me ha brindado sabiduría y perseverancia para alcanzar este logro. Además, quiero agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana y reconocer el esfuerzo y dedicación de los docentes por su invaluable contribución a mi formación académica. La UPS me ha proporcionado un ambiente estimulante y de apoyo proporcionándome oportunidades para desarrollar mis habilidades y conocimientos.

A mi amada familia, quienes han sido mi roca, mi apoyo inquebrantable en cada paso de este viaje. Sus palabras de aliento, paciencia y comprensión me han dado fuerzas para seguir adelante cuando las dificultades parecían abrumadoras.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutor de tesis, el Ing. Daniel Freire por su invaluable orientación, apoyo y dedicación en la realización del presente estudio. Su experiencia y conocimiento han sido una guía constante en mi camino hacia la investigación y el logro de mis objetivos académicos.

Y, por último, pero no menos importante, a mi mejor amigo Steven Orellana, por estar a mi lado en cada paso de este camino quien, con sus palabras alentadoras, y sentido del humor y su presencia en los momentos de estrés han hecho que este viaje sea más llevadero.

RESUMEN

Arthrospira platensis (espirulina), es una cianobacteria mundialmente conocida por ser considerada como superalimento, porque posee grandes cantidades de proteínas, ácidos grasos y vitaminas. El costo y la composición del medio de cultivo para su crecimiento han sido los principales desafíos en la producción de esta microalga. El presente estudio se centró en optimizar dos fuentes de nitrógeno (urea y nitrato de potasio) para maximizar el crecimiento de *A. platensis y* la producción de ficocianina, pigmento fotosintético de gran valor comercial.

La optimización se realizó mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño central compuesto (DCC), conformado por dos factores y cinco niveles de concentración. El DCC evaluó los efectos los dos factores sobre las variables de respuesta; se llevaron a cabo nueve tratamientos con dos repeticiones. Además, se utilizó un modelo polinomial cuadrático para predecir las respuestas.

El análisis de varianza (ANOVA) fue utilizado para validar el modelo escogido, que reveló que las distintas concentraciones de urea fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en la biomasa y la producción de ficocianina. Sin embargo, el nitrato de potasio (KNO_3) no demostró influencia significativa en las variables de respuesta. Para biomasa y ficocianina los valores de R^2 fueron de 0.84 y 0.82, respectivamente; que denota que los modelos cuadráticos fueron satisfactorios para analizar las interacciones entre factores y respuestas.

El análisis MSR indicó que las concentraciones óptimas de los factores KNO_3 y urea para maximizar las variables de respuesta fueron 4.5 g/L y 0.101 g/L, respectivamente. En condiciones óptimas, los valores experimentales de biomasa y ficocianina mostraron concordancia con los valores predichos. Adicionalmente, se evaluó la tendencia de consumo de los nutrientes: nitratos, sulfatos, fosfatos y amoniaco; también se analizó la correlación de los factores urea y KNO_3 con las concentraciones de amoniaco y nitratos, respectivamente.

Finalmente, los resultados experimentales demostraron que la concentración de urea tiene gran influencia en las variables de respuesta. Además, los valores experimentales coinciden con los valores previstos, lo que confirma la idoneidad del modelo. También se evaluó la eficacia de utilizar la MSR para optimizar las concentraciones de los factores estudiados.

Palabras clave: espirulina, significancia, producción, biomasa, pigmento.

ABSTRACT

Arthrospira platensis (spirulina) is a cyanobacterium known worldwide for being considered a superfood, since it contains large amounts of proteins, fatty acids and vitamins. The cost and composition of the culture medium for its growth have been the main challenges in the production of this microalga. The present study focused on optimizing two nitrogen sources (urea and potassium nitrate) to maximize the growth of *A. platensis* and the production of phycocyanin, a photosynthetic pigment of great commercial value.

Optimization was performed by response surface methodology (RSM) using a central composite design (CCD), constituted of two factors and five concentration levels. The CCD evaluated the effects of the factors on the response variables, for which nine treatments with two replications were carried out. In addition, a quadratic polynomial model was used to predict the responses.

Analysis of variance (ANOVA) was used to validate the chosen model, which revealed that different urea concentrations were statistically significant ($p < 0.05$) on biomass and phycocyanin production. However, KNO3 showed no significant influence on the response variables. For biomass and phycocyanin the R2 values were 0.84 and 0.82, respectively; which denotes that the quadratic models were satisfactory for analyzing factor-response interactions.

MSR analysis indicated that the optimum concentrations of the factors KNO3 and urea to maximize the response variables were 4.5 g/L and 0.101 g/L, respectively. Under optimal conditions, the experimental values of biomass and phycocyanin showed agreement with the predicted values. Additionally, the consumption trend of the nutrients nitrates, sulfates, phosphates and ammonia was evaluated; the correlation of the factors urea and KNO3 with ammonia and nitrate concentrations, respectively, was also analyzed.

Finally, the experimental results showed that urea concentration has a great influence on the response variables. Moreover, the experimental values agree with the predicted values, confirming

the suitability of the model. The effectiveness of using MSR to optimize the concentrations of the studied factors was also evaluated.

Key words: spirulina, significance, production, biomass, pigment.

Índice de contenidos

1 Introducción 1

2 Objetivos 3

2.1 Objetivo general 3

2.2 Objetivos específicos 3

3 Marco Teórico 3

3.1 Espirulina (*Arthrospira platensis*) 3

3.1.1 Composición bioquímica de *Arthrospira platensis* 4

3.1.2 Importancia de la espirulina en la alimentación y a nivel económico 5

3.1.3 Condiciones de cultivo de *Arthrospira platensis* 6

3.1.4 Medios de cultivo para el crecimiento de *Arthrospira platensis* 7

3.2 Ficocianina 11

3.2.1 Beneficios de la ficocianina 11

3.2.2 Métodos de extracción y purificación de ficocianina 12

3.2.3 Cuantificación de ficocianina 14

3.3 Diseño de Experimentos 14

3.3.1 Experimento y unidad experimental 15

3.3.2 Componentes del diseño experimental 15

3.3.3 Objetivos de un diseño experimental 17

3.4 Optimización de procesos: metodología de superficie de respuesta (MSR) 17

3.4.1 Etapas en la búsqueda del punto óptimo 18

3.4.2 Componentes de la MSR.....18
3.5 Repetibilidad y reproducibilidad de un proceso.....19
4 Materiales y métodos.....20
4.1 Material biológico inicial.....20
4.2 Producción de biomasa previa al inicio del diseño experimental.....21
4.3 Elaboración del diseño experimental.....21
4.4 Cuantificación de biomasa previa a la inoculación en cada tratamiento.....23
4.4.1 Extracción de biomasa de *Arthrospira platensis*.....23
4.4.2 Determinación de peso seco.....23
4.5 Cuantificación de la concentración de ficocianina.....24
4.5.1 Extracción de ficocianina.....24
4.5.2 Cuantificación de la ficocianina por espectrofotometría.....25
4.5.3 Cálculo del porcentaje de ficocianina.....26
4.6 Cuantificación de sales minerales.....26
4.6.1 Cuantificación de la concentración de nitratos.....27
4.6.2 Cuantificación de la concentración de fosfatos.....28
4.6.3 Cuantificación de la concentración de sulfatos.....29
4.6.4 Cuantificación de sales de amoniaco.....30
4.7 Análisis estadístico.....31
5 Resultados y discusión.....34
5.1 Tendencia en el crecimiento de biomasa de *Arthrospira platensis* y producción de ficocianina…….....35
5.2 Reproducibilidad con respecto al porcentaje de ficocianina.....38

5.3 Modelos de regresión cuadrática y análisis de varianza (ANOVA) 39
5.3.1 Calidad del ajuste 42
5.4 Análisis de la superficie de respuesta de biomasa 45
5.4.1 Superficie de respuesta y curvas de contorno para biomasa 46
5.5 Análisis de superficie de respuesta de ficocianina 48
5.5.1 Superficie de respuesta y curvas de contorno para ficocianina 49
5.6 Optimización y validación de modelos 50
5.7 Correlación entre el consumo de nitratos frente a la producción de biomasa y ficocianina 52
5.8 Correlación entre el consumo de amoníaco frente a la producción de biomasa y ficocianina 54
5.9 Tendencia de consumo de sulfatos y fosfatos frente al crecimiento de biomasa y producción de ficocianina 57
6 Conclusiones y recomendaciones 59
7 Bibliografía 61
8 Anexos 70

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de Arthrospira platensis. 4

Figura 2: Estructuras del monómero de ficocianina y el pigmento ficocianobilina. 11

Figura 3. Componentes necesarios para la construcción de un diseño experimental. 17

Figura 4. Representación y construcción de los DCC para k = 2 y 3 factores. 19

Figura 5. Proceso de extracción de ficocianina a partir de Arthrospira platensis. 25

Figura 6. Proceso de cuantificación de nitratos (NO_3^-) utilizando el equipo Hach – DR 900. 27

Figura 7. Proceso de cuantificación de fosfatos (PO_4^{3-}) utilizando el equipo Hach – DR 900. 28

Figura 8. Proceso de cuantificación de sulfatos (SO_4^{2-}) utilizando el equipo Hach – DR 900. 29

Figura 9. Proceso de cuantificación de amoniaco (NH_3 - N) utilizando el equipo Hach – DR 900. . 30

Figura 10. Geometría de trapecios para la determinación del área bajo la curva. 32

Figura 11. Líneas de tendencia de crecimiento de la biomasa de Arthrospira platensis. 37

Figura 12. Líneas de tendencia de crecimiento en el porcentaje (%) de ficocianina. 38

Figura 13. Gráficas de probabilidad Normal para residuos. 44

Figura 14. Gráficas de residuos vs. predichos. 44

Figura 15. Gráficas de efectos principales y Pareto para biomasa. 45

Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta de biomasa frente a los factores urea y KNO_3 47

Figura 17. Gráfica de curvas de contorno para biomasa frente a los factores urea y KNO_3. 47

Figura 18. Gráfica de efectos principales y de Pareto para ficocianina. 48

Figura 19. Gráfica de superficie de respuesta para ficocianina. 49

Figura 20. Gráfica de curvas de contorno para ficocianina. 50

Figura 21. Resultados de la optimización de los factores y determinación del coeficiente de deseabilidad. 51

Figura 22. Líneas de tendencia de consumo de nitratos (NO_3^-). 54

Figura 23. Líneas de tendencia de consumo de amoniaco (NH_3). 55

Figura 24. Líneas de tendencia de consumo de sulfatos (SO_4^{2-}).....57

Figura 25. Líneas de tendencia de consumo de fosfatos (PO_4^{3-}) 58

Índice de tablas

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos de A. platensis y sus longitudes de onda de absorbancia 5

Tabla 2. Medio de Cultivo Zarrouk. 7

Tabla 3. Medio de cultivo industrial ACMA (Sal de Mar).....8

Tabla 4. Medio de cultivo industrial SOLARIUM (Salitre) 8

Tabla 5. Medio de cultivo para producción de biomasa inicial modificado de Zarrouk (1996).....21

Tabla 6. Factores y codificación por niveles.....22

Tabla 7. Tratamientos generados a partir del diseño central compuesto 22

Tabla 8. Diseño experimental DCC y resultados (promedio de réplicas).....35

Tabla 9. Modelos de regresión cuadrática ajustada 39

Tabla 10. Análisis de varianza ANOVA para el modelo de regresión de ajuste de biomasa 41

Tabla 11. Análisis de varianza ANOVA para el modelo de regresión de ajuste para ficocianina 42

Tabla 12. Coeficientes R^2 y R^2_{aj} de los modelos de regresión cuadrática.....43

Tabla 13. Resultados generados de la optimización de factores.....51

Tabla 14. Comparación del mejor tratamiento frente a los resultados optimizados.....52

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) del factor KNO_3 y la concentración de NO_3^- 53

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) del factor urea y la concentración de amoniaco (NH_3) ..56

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de biomasa 23

Ecuación 2. Cálculo para la determinación de la concentración de ficocianina (mg/mL). 25

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de humedad de la biomasa húmeda 26

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje (%) de sólidos 26

Ecuación 5. Cálculo de la constante de humedad. 26

Ecuación 6. Determinación del porcentaje (%) de humedad 26

Ecuación 7. Cálculo del área de un trapecio 32

Ecuación 8. Modelo de regresión cuadrática ajustada para biomasa 39

Ecuación 9. Modelo de regresión cuadrática ajustada para ficocianina. 39

Índice de anexos

Anexo 1. Tabla de resultados del DDC de las 18 corridas experimentales. Resultados totales de todo el período experimental. 70

Anexo 2. Tabla de resultados de biomasa (g/L): datos obtenidos a partir de la técnica de peso seco. 71

Anexo 3. Tabla de resultados de ficocianina (g/L). 72

Anexo 4. Tabla de resultados del porcentaje (%) de ficocianina. 73

Anexo 5. Tabla de resultados de consumo de Nitratos NO_3^- (mg/L) 74

Anexo 6. Tabla de resultados de consumo de amoniaco NH_3 (mg/L) 75

Anexo 7. Tabla de resultados de consumo de fosfatos PO_4^{3-} (mg/L) 76

Anexo 8.Tabla de resultados de consumo de sulfatos SO_4^{2-} (mg/L) 77

1 Introducción

Arthrospira platensis, es una cianobacteria filamentosa fotosintética planctónica de agua dulce que tiene varias actividades biológicas y un gran valor nutricional, es conocida como un súper alimento ya que en su composición contiene altos niveles de proteínas de alta digestibilidad, aminoácidos esenciales, vitaminas, ácidos grasos poliinsaturados, minerales, polifenoles, carotenoides y clorofila. El color verde azulado de *A. platensis* se debe a la presencia del pigmento C-ficocianina, y tiene gran importancia debido a su actividad anticancerígena. Esta microalga, es conocida comercialmente como espirulina, y tiene diferentes aplicaciones industriales, por ejemplo, como suplemento alimenticio, en cosméticos y en productos para la salud (Martelli et al., 2020; Nosratimovafagh et al., 2022).

La ficocianina es una importante biliproteína captadora de luz que forma parte del esqueleto de la espirulina. En la actualidad se considera a la ficocianina como un potencial alimento funcional. Este pigmento tiene muchas actividades biológicas, como antioxidante, antibacteriana, antiinflamatorio, y actúa contra la fibrosis pulmonar. Además, este compuesto presenta propiedades antineoplásicas en diferentes células cancerosas, como el cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de colon y melanoma maligno (Hao et al., 2019; Liu et al., 2022).

La productividad de biomasa de *Arthrospira platensis* es dependiente de parámetros de cultivo ajustados, entre ellos, la temperatura, la calidad e intensidad de la luz, la disponibilidad de nutrientes, salinidad del medio de cultivo, entre otros factores. Varios elementos pueden controlar el crecimiento celular, como las fuentes de carbono (C) y nitrógeno (N), los iones metálicos y el pH del medio. Por lo tanto, es esencial utilizar la composición de cultivo óptima para obtener un alto rendimiento en la producción de compuestos celulares de interés (ficocianina) (Colla et al., 2007).

El diseño de experimentos es una herramienta estadística que examina los factores y sus diferentes niveles simultáneamente mediante un número reducido de experimentos a través de modelos

factoriales fraccionados, como la metodología de superficie de respuesta para evaluar interacciones más relevantes entre variables (Cosenza et al., 2022).

La optimización de estos factores presenta complejidad debido al elevado número de componentes de los medios con efectos no lineales e interactivos entre las células, el medio de cultivo y el entorno del reactor (Brunner et al., 2010; Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Para gestionar la complejidad que representa la fabricación de un nuevo medio de cultivo artesanal y su optimización, es necesario emplear métodos de diseño de experimentos, en donde los factores (concentraciones de nitrógeno u otros componentes, o condiciones ambientales) se establecen en un valor específico y consecuentemente se miden los resultados. El objetivo de utilizar métodos de diseños de experimentos, en específico, un diseño central compuesto, es encontrar correlaciones estadísticamente significativas en menos experimentos que en técnicas como la intuición, secuencias de un solo factor a la vez o diseños aleatorios (Cosenza et al., 2022).

En este proyecto se desea optimizar la composición del medio de cultivo artesanal para aumentar la biomasa de *Arthrospira platensis* y consecuentemente la producción de ficocianina, a través de métodos de diseños de experimentos, en donde los factores significativos, que son las dos fuentes de nitrógeno seleccionadas (nitrato de potasio y urea), serán optimizados utilizando la metodología de superficie de respuesta en un diseño central compuesto con el fin de obtener la composición óptima del medio de cultivo artesanal.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Diseñar el proceso experimental para la optimización de un medio de cultivo artesanal probando distintas concentraciones (gL^{-1}) de dos fuentes de nitrógeno (KNO_3 y urea) para la producción de ficocianina a partir de *Arthrospira platensis.*

2.2 Objetivos específicos

- Establecer un diseño central compuesto mediante la metodología de superficie de respuesta para la producción de ficocianina variando las concentraciones (g/L) de KNO_3 y urea.
- Cuantificar de la concentración (g/L) de ficocianina producida, a partir del análisis de las cinéticas de crecimiento de *Arthrospira platensis* de cada uno de los tratamientos con distintas concentraciones (g/L) de KNO_3 y urea.
- Evaluar el consumo (g/L) de los sustratos limitantes: NO_3^-, NH_3, PO_4^{3-}, y SO_4^{2-}, del medio de cultivo artesanal a diferentes concentraciones (g/L) de KNO_3 y urea.

3 Marco Teórico

3.1 Espirulina (*Arthrospira platensis*)

La espirulina es una alga verde-azulada, de nombre científico *Arthrospira platensis.* Esta especie acuática pertenece a la clase de cianobacterias con capacidad de realizar fotosíntesis; también las algas espirulina son multicelulares, filamentosas y procariotas. Los filamentos que poseen no están ramificados y tienen la forma de un espiral. Se encuentran comúnmente en ambientes tropicales y subtropicales, donde se desarrollan de forma natural en medios acuáticos con altos niveles de sal y alcalinidad (AlFadhly, Alhelfi, Altemimi, Verma, Cacciola, et al., 2022).

Arthrospira platensis realiza fotosíntesis oxigénica, utiliza el agua como donante de electrones y dióxido de carbono como fuente de carbono. La espirulina se reproduce por fisión binaria y crece formando tricomas helicoidales filamentosos, con un tamaño entre 200 y 250 μm. Los factores que predominan en el desarrollo de esta cianobacteria son la luz y el dióxido de carbono. Según Jung

et al. (2021), el ciclo de vida de *Arthrospira platensis* (ver Figura 1) en un biorreactor consta de seis fases:

1. Tricoma maduro en la fase de crecimiento estacionario. Proceso de crecimiento dentro del biorreactor de respaldo. Aquí se procede a la inoculación en el biorreactor de estudio.
2. Formación de necridios que son células que se encuentran en los tricomas, las cuales mueren para liberar un fragmento filamentoso (hormogonio) (Dreckmann et al., 2013).
3. Escisión de agregados celulares y formación de hormogonios, los mismos que tienen la capacidad de formar nuevos tricomas maduros (Dreckmann et al., 2013).
4. Crecimiento de hormogonios por fisión binaria formando nuevos tricomas.
5. Los tricomas aumentan de longitud mediante división celular.
6. Los tricomas alcanzan la típica forma helicoidal.

Ciclo de vida de *Arthrospira platensis*

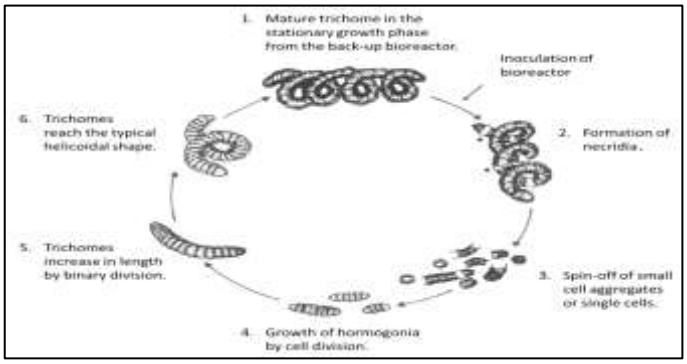

Figura 1. Ciclo de vida de *Arthrospira platensis.*

Fuente: (Jung et al., 2021).

3.1.1 Composición bioquímica de *Arthrospira platensis*

A partir de la espirulina se han elaborado productos naturales con beneficios nutricionales y para la salud, como proteínas, pigmentos, polisacáridos, ácidos grasos poliinsaturados y aminoácidos. Esta especie de microalga tiene gran importancia a nivel mundial, con una producción de miles de toneladas por año. En el año 2016 se produjeron 89000 toneladas (Ljubic et al., 2018). *A. platensis* posee hasta un 60 % en peso seco de proteínas, polisacáridos entre un 15 % a 25 % en peso seco,

ácidos grasos poliinsaturados entre 3 % a 9 % en peso seco y pigmentos entre ellos la ficocianina y los carotenos (Elain et al., 2020).

3.1.1.1 Pigmentos de *Arthrospira platensis*

Esta cianobacteria está compuesta de varios pigmentos fotosintéticos, entre ellos la clorofila *a*, carotenoides y ficobiliproteínas (ficocianina y aloficocianina *a* y *b*) (Wu et al., 2021). Cada uno de los pigmentos presenta distintas longitudes de onda en la determinación de la absorbancia, como se señalan en la Tabla 1.

Tabla 1. Pigmentos fotosintéticos de *A. platensis* y sus longitudes de onda de absorbancia

Pigmentos fotosintéticos	**Longitudes de ondas de absorbancia**
Clorofila *a*	665.2 nm
Carotenoides	470 nm
Aloficocianina *a*	650 nm
Aloficocianina *b*	671 nm
Ficocianina	620 nm

Fuente: (Wu et al., 2021).

Elaborado por: (La autora, 2023).

3.1.2 Importancia de la espirulina en la alimentación y a nivel económico

Este organismo tiene una gran importancia a nivel nutricional por su elevado contenido de proteínas, aproximadamente entre un 60% y un 70% en peso seco. Además, contiene vitaminas, minerales, ácidos grasos esenciales y otros nutrientes; por consiguiente, la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) ha catalogado a la espirulina como un “súper alimento” y ha recibido el título de “alimento del futuro” (Haoujar et al., 2022).

La espirulina tiene diversas aplicaciones en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética y agrícola. Esta microalga se la puede adquirir fácilmente ya que tiene una amplia distribución geográfica; esta especie crece en lagos alcalinos subtropicales con una temperatura óptima de 35

°C. El país con mayor producción de *A. platensis* es China, posee alrededor de dos tercios de la producción mundial; también en regiones como Centro América, África, las Islas de Hawaii, cultivan grandes cantidades de espirulina (Masojídek & Torzillo, 2014; Wu et al., 2021).

Las industrias desean obtener la biomasa de espirulina para utilizar sus principios activos, como lo son la ficocianina, carotenoides, polifenoles, ácidos grasos poliinsaturados, vitaminas, esteroles, entre otros. En la industria farmacéutica, la espirulina tiene un importante papel terapéutico, ya que es usada en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, colesterol elevado, niveles altos de azúcar en sangre, obesidad, enfermedades inflamatorias, etc. También, esta alga contribuye en el fortalecimiento del sistema inmunológico y está relacionada con la ralentización en el progreso de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, Alzheimer y la esclerosis múltiple (Andrade et al., 2018). Esta alga ha sido utilizada en la elaboración de suplementos alimenticios, y en la fabricación de medicamentos naturales. Puede presentar distintos formatos como polvo, líquido, aceite, cápsulas o tabletas. La espirulina presenta una alta gama de usos en distintas áreas biológicas, ya sea en la nutrición humana, así como en la alimentación animal, por ejemplo, sirve de alimento para peces (Bleakley & Hayes, 2017).

3.1.3 Condiciones de cultivo de *Arthrospira platensis*

El cultivo de espirulina puede realizarse tanto en sistemas abiertos en donde las cianobacterias se encuentran expuestas a la atmósfera, y en sistemas cerrados (fotobiorreactores), en este caso el cultivo tiene poco o ningún contacto con la atmósfera. Los fotobiorreactores son utilizados preferentemente ya que permite obtener mayor rendimiento en la producción de biomasa. Además, varios factores intervienen en la producción de biomasa de *Arthrospira platensis* como son la temperatura, la tasa de aireación, la concentración de CO2, fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato (Maza et al., 2017).

Según Lisett et al. (2014), *Arthrospira platensis* muestra mayor crecimiento en un rango de temperatura entre 25 – 40°C, el medio de cultivo debe tener un pH entre 10 y 11, salinidad en un intervalo de 18 – 22 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad) e iluminación de 30-50 klux. Además,

Fernández Honores et al. (2019) señalan que para un crecimiento adecuado es fundamental incorporar agitación a las células, de esta forma se previene la sedimentación y se consigue una distribución uniforme de los nutrientes, CO2 y luz.

3.1.4 Medios de cultivo para el crecimiento de *Arthrospira platensis*

El medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1966) es comúnmente utilizado para el crecimiento y producción de esta alga. En este medio de cultivo los primeros cinco días son importantes ya que ocurre un mayor crecimiento de esta especie. Los componentes que conforman este medio de cultivo se visualizan en la Tabla 2.

Tabla 2. Medio de Cultivo Zarrouk.

Componentes	**g/L H_2O**
$NaHCO_3$	16,8
K_2HPO_4	0,5
$NaNO_3$	2,5
K_2SO_4	1,0
NaCl	1,0
$MgSO_4.7H_2O$	0,2
$CaCl_2$	0,04
$FeSO_4.7H_2O$	0,01
EDTA (Ácido tetracético diamino etileno)	0,08

Fuente: (Zarrouk, 1966).

Elaborado por: (La autora, 2023).

Existen otros medios de cultivo para espirulina tales como el medio de cultivo Industrial ACMA o también llamado *Sal de Mar* y el medio de cultivo industrial SOLARIUM o Salitre. En las Tablas Tabla ***3*** y Tabla ***4***, observamos los componentes de cada uno de los medios de cultivo respectivamente.

Tabla 3. Medio de cultivo industrial ACMA (Sal de Mar)

Componente	Cantidad
Agua filtrada	100 L
Sal de mar	700 g
K_2HPO_4	3,5 g
$FeSO_4$	0,43 g
NH_4HCO_3	12,5 g

Fuente: (Planchón & Fuentes, 1993)

Elaborado por: La autora, 2023

Tabla 4. Medio de cultivo industrial SOLARIUM (Salitre)

Componente	Cantidad
Agua destilada	100 L
Salitre	300 g
Sal	500 g
$NaHCO_3$	700 g
Solución Fe	
$FeSO_4$	50 g
H_2SO_4	10 mL
Urea	20 g
Solución P	
Fosfato di amínico	100 g
HCl	50 L
H_2O	1000 L

Fuente: (Planchón & Fuentes, 1993)

Elaborado por: La autora, 2023.

3.1.4.1 Nitrógeno como nutriente

El nitrógeno juega un papel importante en el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas de *A. platensis;* es un componente esencial de los aminoácidos, por lo que es requerido para sintetizar proteínas. Entre estas proteínas encontramos a la clorofila y la ficocianina, que son pigmentos responsables de la actividad fotosintética de *A. platensis* y consecuentemente la producción de biomasa. Además, este elemento participa en varios procesos metabólicos, como la síntesis de ácidos nucleicos, lípidos y aminoácidos, procesos cruciales para la división celular, el almacenamiento de energía, y el crecimiento general (Shanthi et al., 2018).

Para el cultivo de espirulina se han utilizado diferentes tipos de efluentes industriales ricos en nitrógeno inorgánico, en forma de nitrato, nitrito y amonio. De acuerdo con Mashor et al. (2015), el 25 % de la productividad total de las microalgas está relacionada con el uso de medios de cultivo que suministren nutrientes, particularmente nitrógeno y fósforo. Sin embargo, concentraciones excesivas de este compuesto pueden inhibir el desarrollo de la microalga (Shanthi et al., 2018).

A pesar del uso de nitratos de sodio y potasio como fuentes de nitrógeno en la producción de medios de cultivo comerciales, con excelentes resultados en el crecimiento de la biomasa microalgal; se ha utilizado como una fuente alternativa de nitrógeno a la urea, con el fin de reducir costos en la elaboración de medios de cultivo. Este compuesto ha mostrado resultados satisfactorios en el crecimiento celular, debido a que puede ingresar directamente a las células sin gasto de energía (Mashor et al., 2015).

3.1.4.2 Fósforo como nutriente

El fósforo es un componente importante en la producción de biomasa de *A. platensis*. Este nutriente es indispensable porque forma parte de la estructura de diversas moléculas, como en los ácidos nucleicos (ADN y ARN) que conforman el material genético de las células, los fosfolípidos en las membranas y el ATP (Çelekli et al., 2009).

En el cultivo de microalgas, se utiliza fosfatos o superfosfatos de amonio, potasio o sodio, como fuentes de fósforo. La incorporación de fósforo inorgánico a las células de *A. platensis* es por

medio de un transporte activo, mediante la acción de enzimas fosfatasas para luego convertirlo en la forma molecular ortofosfato. La espirulina tiene un mecanismo de almacenamiento de fósforo, en donde consume fósforo en cantidades mayores a las requeridas para su crecimiento y lo almacena como polifosfatos en forma intracelular. El consumo de fósforo se incrementa a medida que aumenta la intensidad de la luz (Markou et al., 2012; Mateucci, 2018).

La limitación de este nutriente provoca clorosis, afectación en la que los pigmentos como la clorofila, o ficocianina se degradan; también la insuficiente cantidad de fósforo en los medios de cultivo provoca la acumulación de carbohidratos y se reduce el contenido de proteínas en las microalgas (Markou et al., 2012).

3.1.4.3 Azufre como nutriente

El azufre contenido en los sulfatos tiene una influencia importante en el rendimiento del crecimiento y el estado bioquímico, incluida la actividad de las enzimas antioxidantes de *A. platensis.* En el estudio realizado por Jin & Lu (2015), un análisis microscópico reveló que el número de verticilos y filamentos de esta microalga está influenciado por la concentración de sales de sulfato. En medios de cultivo en donde las concentraciones de sales de sulfato son bajas, se ha registrado un bajo rendimiento de crecimiento debido a que la falta de azufre podría causar una reducción en la multiplicación celular, al mismo tiempo que influye en el metabolismo del carbono y en la actividad fotosintética (El-Shouny et al., 2015).

Además, la presencia de azufre en los medios de cultivo de espirulina promovieron la síntesis de aminoácidos como la cisteína, que es un componente de las proteínas que conforman a la clorofila. Por otro lado, la presencia de sales de sulfato como nutriente para las microalgas, aumentaron la actividad de las enzimas antioxidantes polifenol oxidasa (PPO) y la peroxidadsa (POD), enzimas importantes para contrarrestar los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Un suministro adecuado de sulfato conlleva a una producción óptima de biomasa, proteína y acumulación de cisteína (Magwell et al., 2021).

3.2 Ficocianina

La ficocianina es una proteína de pigmento azul fotosintético que se encuentra ampliamente en las algas de *Arthrospira platensis*; tiene la capacidad de captar luz y es soluble en agua. Su estructura química se conforma de tres moléculas de ficocianobilina (PCB). Cada molécula de ficocianobilina es un pigmento tetrapirrol lineal. Dos moléculas de ficocianobilina se unen mediante enlaces tioéter a la subunidad proteica β, y una molécula de ficocianobilina se adhiere a la subunidad proteica α. En la Figura *2* se observa la estructura de un monómero de ficocianina, en donde una molécula de ficocianobilina se encuentra conectada a la cisteína-84 de la cadena proteica α, y dos ficocianobilinas ubicadas en la cisteína 84 y 155 de la cadena β (Liu et al., 2022).

Estructuras del monómero de ficocianina y el pigmento ficocianobilina

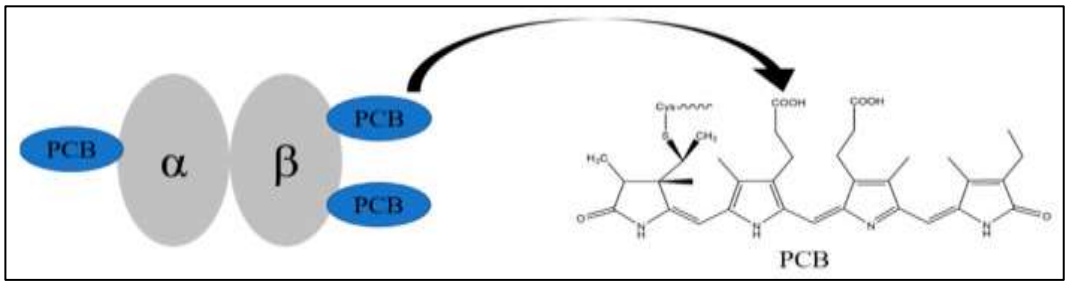

Figura 2: Estructuras del monómero de ficocianina y el pigmento ficocianobilina.

Fuente: (Liu et al., 2022).

3.2.1 Beneficios de la ficocianina

La ficocianina tiene diversas actividades biológicas como antioxidante, antiinflamatorio, inmunomoduladoras y antibacterianas. Igualmente, la ficocianina es utilizada como componente nutricional, colorante natural alimentario, marcador fluorescente, y en cosméticos se usa como aditivo en la fabricación de productos de belleza como lápiz labial y delineador de ojos (Aoki et al., 2021).

Este pigmento fotosintético ejerce efectos anticancerígenos, ya que presenta buenos valores antineoplásicos en distintas células cancerosas, como el cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de colon, y melanoma maligno. Además, la ficocianina tiene una importante

función inhibitoria en la proliferación de células de cáncer de pulmón (Hao et al., 2019; Liao et al., 2016).

Blas-Valdivia et al. (2022) manifiestan que la ficocianina posee acción cardioprotectora frente al infarto agudo de miocardio, previniendo el estrés oxidativo, la inflamación y el daño cardíaco. También, este pigmento azul tiene funciones hepatoprotectoras, contribuye a la restauración de las células en lesiones renales y previene la inflamación intestinal (Y. Li et al., 2022).

3.2.2 Métodos de extracción y purificación de ficocianina

Existen algunos inconvenientes al momento de extraer ficocianina de las células de espirulina debido a que sus paredes celulares poseen varias capas. El proceso de extracción de ficocianina comprende de múltiples pasos que pueden realizarse mediante métodos físicos o químicos y de esta forma obtener el pigmento fotosintético; a continuación, se detallarán algunos procesos de extracción de ficocianina:

Kumar et al. (2014) proponen el siguiente método de extracción; en primer lugar centrifugar 500 mL de cultivo en fase logarítmica homogeneizada (aproximadamente después de 15 días del inicio del cultivo) a 4000 rpm y así obtener un sedimento. Luego se procede a resuspender el sedimento en 100 mL de buffer acetato 20 mM (pH-5,10), que contiene cloruro sódico 50 mM y azida sódica 0,002 M. Para la ruptura celular se realiza congelación repetida (-20 °C) y descongelación a temperatura ambiente hasta que el pigmento azul colorea la solución tampón de acetato. Se procede a eliminar los restos celulares mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min, y el sobrenadante es denominado como extracto crudo.

Para purificar el extracto crudo, se procede a realizar una precipitación de un solo paso, en donde se utiliza $(NH_4)_2SO_4$ al 65 % de pureza, y se conserva a temperatura de 4 °C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, el precipitado se obtiene por centrifugación a 27000 rpm durante 15 min a 4 °C. El producto de la centrifugación es resuspendido en 10 mL del buffer de extracción (tampón acetato). La solución compuesta por el precipitado más buffer acetato, pasa por un proceso de diálisis utilizando una membrana especial para este fin. La diálisis se realiza dos veces empleando

1000 mL de tampón de extracción en cada una; la primera diálisis se realiza a temperatura ambiente y la segunda a 4 °C durante 12 horas. El extracto obtenido de la diálisis pasa a través de un filtro de 0,45 μm de diámetro (Kumar et al., 2014).

De acuerdo con Kumar et al. (2014), en el paso final de la purificación se realiza una cromatografía de intercambio aniónico, para ello se usa dietilaminoetil celulosa (DEAE-CELULOSA). Primero se usa una columna de 30 x 2 cm y se equilibra con 150 mL de tampón acetato. El extracto dializado es colocado en la columna, en donde se emplea un gradiente lineal de buffer de acetato. Después los eluidos se recogieron en fracciones de 5 mL. Para este procedimiento el caudal usado es de 20 mL/h. Finalmente, el espectro de absorción se determina mediante espectrofotometría, en un rango de 300 a 750 nm.

Otro método de extracción y purificación es el propuesto por Seo et al. (2013), quienes manifiestan un método de extracción más efectivo mediante el empleo de altas presiones, bajas temperaturas y hexano como disolvente, lo que resulta en altos rendimientos en la obtención de producto y menores daños por desnaturalización. Las altas presiones permiten que la membrana celular se rompa de forma irreversible ya que se produce una separación de los enlaces débiles como los enlaces de hidrógeno, enlaces de Van der Waals. Además, el uso de presiones altas induce a cambios morfológicos y estructurales en las macromoléculas, sin embargo, las micromoléculas como los aminoácidos y las vitaminas no sufren mayor daño. Este método permite aislar el pigmento fotosintético de Spirulina, el mismo que presenta mayor estabilidad y un grado mayor de pureza.

Choi & Lee (2018), platean un método de extracción de ficocianina utilizando ultrasonicación a temperatura ambiente. En este procedimiento se utiliza agua destilada a 25 °C durante 24 h. La frecuencia empleada fue de 60 kHz, con una potencia de 120 W. El extracto obtenido se filtra a través de un filtro de 20 μm de diámetro y luego se condensa en un evaporador rotatorio al vacío. Después, el producto obtenido pasa por un proceso de liofilización. Este método es capaz de concentrar altas cantidades de ficocianinas intactas, sin realizar un tratamiento previo y sin la adición de solventes de extracción.

3.2.3 Cuantificación de ficocianina

Un método de cuantificación es el reportado por Aoki et al. (2021), en donde se toman 200 µL del cultivo celular y se coloca en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Utilizando espectrofotometría se mide el espectro de absorción utilizando longitud de onda de 618 nm, dicha longitud indica la producción de ficocianina. La relación entre el valor de absorbancia a esa longitud de onda y la cantidad de ficocianina es proporcional.

Según Seo et al. (2013), para obtener una evaluación más precisa se debe realizar la medición del peso molecular de la ficocianina mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y se compara con el estándar de ficocianina. Las subunidades polipeptídicas α y β de la molécula de ficocianina tienen pesos moleculares de 18,4 kDa y 21,3 kDa, respectivamente.

En la revisión realizada por Kuddus et al. (2013), se menciona que se puede extraer mayores cantidades de ficocianina a partir de biomasa secada a bajas temperaturas. Se evidencia que a 25°C se extraen 80 mg de ficocianina por gramo de biomasa seca, mientras que, a 50 °C solamente se extraen 16,5 mg de ficocianina por gramo de biomasa seca.

3.3 Diseño de Experimentos

A menudo, cuando se realizan investigaciones es necesario realizar experimentos o pruebas que permitan resolver un problema o la comprobación de una hipótesis inicialmente propuesta. Para garantizar una buena respuesta a las hipótesis planteadas se debe seguir un plan experimental adecuado. El diseño estadístico de experimentos es la forma eficaz en la realización de pruebas de investigación, que consiste en definir qué pruebas deben llevarse a cabo, con el objetivo de obtener datos que posteriormente serán analizados estadísticamente. Los resultados obtenidos de este análisis estadístico proporcionarán información necesaria para dar respuesta a las interrogantes planteadas. El diseño experimental facilita resolver problemas y consecuentemente lograr mejoras en los procesos (Gutiérrez Pulido, 2012).

Para Gutiérrez Pulido (2012), el diseño de experimentos “es la aplicación del método científico para generar conocimiento acerca de un sistema o proceso, por medio de pruebas planeadas adecuadamente.”

3.3.1 Experimento y unidad experimental

Se define como experimento a una situación simulada en donde existe un cambio en las condiciones ya sea de una o de diversas situaciones (variable independiente) con el fin de evaluar el efecto de dicho cambio sobre una o varias propiedades del producto o del resultado (variable dependiente) (Murillo, 2011). Se conoce como unidad experimental al objeto o sujeto que está expuesto al tratamiento independientemente de otras unidades (Kuehl, 2000).

3.3.2 Componentes del diseño experimental

En la construcción de un diseño experimental se deben establecer varios componentes esenciales (algunos de ellos se visualizan en la Figura 3), que se mencionan a continuación:

3.3.2.1 Variables de respuesta

Por medio de esta variable se evalúa el efecto o el resultado de cada prueba experimental, por ejemplo, resultados sobre las propiedades de un producto; estas variables permiten valorar el desempeño de un proceso. El diseño experimental tiene como fin mejorar las variables de respuesta, dichas variables se denotan con la letra *y* (Gutiérrez Pulido, 2012).

3.3.2.2 Factores estudiados

Son las variables estudiadas en el experimento de investigación, estos factores influyen sobre las variables de respuesta. Es importante mencionar que para analizar el efecto de un factor es importante evaluar al mismo en al menos dos niveles o condiciones. Los factores son de dos tipos, factores controlables *x* y no controlables *z*. Los primeros son variables que son fijadas en un nivel específico, también estas variables son conocidas como variables de entrada o condiciones de proceso, por ejemplo, en el presente estudio los factores controlables son: las distintas concentraciones de KNO_3 y urea. Al número de factores controlables se denota con la letra *k*.

Mientras, que los factores no controlables son variables que no pueden ser controladas durante el proceso de experimentación, entre estas variables pueden encontrarse las variables ambientales como luz, humedad, partículas, etc. Los factores sean controlables o no, tienen influencia en mayor o menor medida en las variables de respuesta, que en este caso fueron: el crecimiento de biomasa de *A. platensis* y la producción de ficocianina (Gutiérrez Pulido, 2012).

3.3.2.3 Niveles y tratamientos

Se denominan niveles a los distintos valores que serán asignados a cada uno de los factores estudiados dentro de un experimento de investigación. Se define como tratamiento a cada una de las combinaciones de los niveles de todos los factores que serán estudiados (Domínguez & Tostado, 2016). Según Kuehl (2000), un tratamiento es el conjunto de acontecimientos simulados para la realización del experimento, de esta forma generar una respuesta a la hipótesis de investigación. En los estudios de comparativos y de optimización se utilizan dos o más tratamientos y así comparar los efectos en la unidad experimental.

3.3.2.4 Error aleatorio y error experimental

La variabilidad que ocurre en la respuesta y no puede ser explicada por los factores estudiados es conocida como error aleatorio. Este tipo de error considera a los pequeños efectos que tienen los factores que no han sido estudiados. Por otro lado, se considera error experimental cuando el experimentador comete errores tanto en la planeación como en la ejecución del proceso experimental (Domínguez & Tostado, 2016).

Componentes del diseño experimental

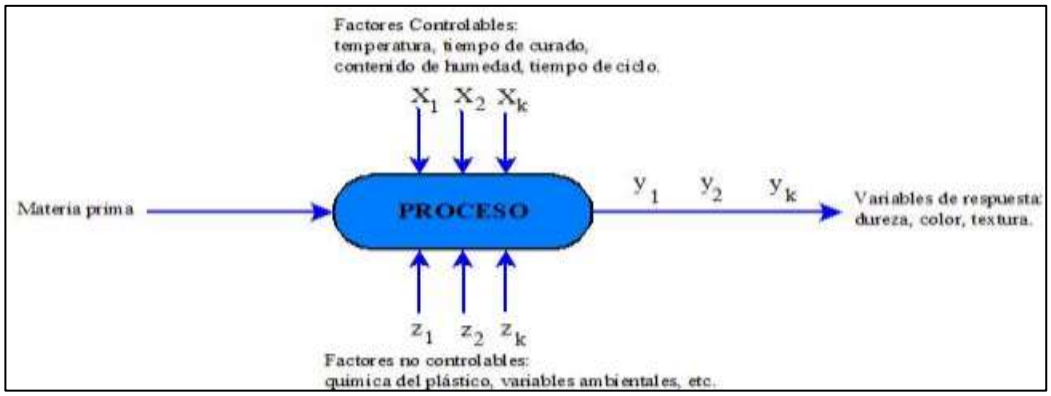

Figura 3. Componentes necesarios para la construcción de un diseño experimental.

Fuente: (Gutiérrez Pulido, 2012).

Elaborado por: La autora, 2023.

3.3.3 Objetivos de un diseño experimental

La realización de un diseño experimental tiene como fin lograr dilucidar respuestas a las hipótesis planteadas. De acuerdo con Montgomery (2014), los objetivos que generan mayor información en la búsqueda de respuestas son los siguientes:

1. Establecer cuáles son las variables *x* que afectan en mayor medida la respuesta de experimentación.
2. Determinar qué ajuste de las *x* influyen en las variables de respuesta *y*, de forma que su valor se acerque al valor deseado.
3. Decidir cuál es el ajuste adecuado para las variables *x* y que la variabilidad de *y* disminuya.
4. Determinar el ajuste apropiado de las *x* que minimice los efectos de las variables no controlables *z*.

3.4 Optimización de procesos: metodología de superficie de respuesta (MSR)

Se considera a la MSR como una estrategia experimental y de análisis cuyo objetivo principal es la resolución de problemas proporcionando las condiciones de operación óptimas de un proceso. Los resultados que se obtienen a partir de dicha estrategia se denominan *valores óptimos* (Gutiérrez Pulido, 2012).

3.4.1 Etapas en la búsqueda del punto óptimo

En la realización de la metodología de superficie de respuestas se destacan tres etapas que son: cribado, búsqueda de primer orden (búsqueda I) y búsqueda de segundo orden (búsqueda II) (Gutiérrez Pulido, 2012). En la etapa de cribado el proceso presenta muchos factores (≥ 6), los cuales influyen en la variable estudiada. La segunda etapa, denominada búsqueda de primer orden (búsqueda I) es empleada cuando la variable de respuesta es afectada por pocos factores (≤ 5) dentro del diseño experimental. En esta etapa se identifica el tipo metodología de superficie de respuesta que se aplicará y la detección de curvatura. Finalmente, la búsqueda de segundo orden (búsqueda II) se utiliza cuando se ha detectado la presencia de curvatura; en esta etapa se caracteriza mejor la superficie y se busca modelar la curvatura. En este proceso se establecen las condiciones óptimas de operación del proceso.

3.4.2 Componentes de la MSR

La metodología de superficie de respuesta consta de los siguientes componentes:

El *diseño*, es decir para lograr la optimización de variables se debe implementar un diseño de experimentos. Preferentemente se requieren diseños que permitan ajustar un modelo de regresión lineal múltiple (Melo et al., 2020). El *modelo* es implementado al mismo tiempo que el diseño escogido, éste utiliza el análisis de regresión lineal múltiple que consta de los siguientes elementos: parámetros del modelo, ajuste del modelo, significancia del modelo, residuos y coeficiente de determinación (Melo et al., 2020).

Por último, la *técnica de optimización*, que consta de varias técnicas matemáticas que permiten explorar un modelo ajustado con el objetivo de obtener información sobre el punto óptimo (Melo et al., 2020).

3.4.2.1 Diseño central compuesto (DDC)

Es un diseño comúnmente utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden, ya que posee una

alta capacidad de adaptabilidad. El DDC se puede establecer a partir de un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} en donde se adicionan puntos sobre los ejes y en el centro. Este diseño se conforma de tres tipos de puntos:

1. El primer punto o también llamado *porción factorial* es una réplica de un diseño factorial de dos niveles, que puede ser completo o fraccionado.
2. n_0 son los puntos o repeticiones, se encuentran al centro del diseño, se condiciona con $n_0 \geq 1$.
3. Finalmente, la *porción axial* que está conformada por cada uno de los dos puntos sobre cada eje a una distancia α del origen.

En la Figura 4 se visualiza el ensamble de cada uno de los puntos mencionados y el DDC resultante para k =2 y 3 factores.

Construcción de un diseño central compuesto

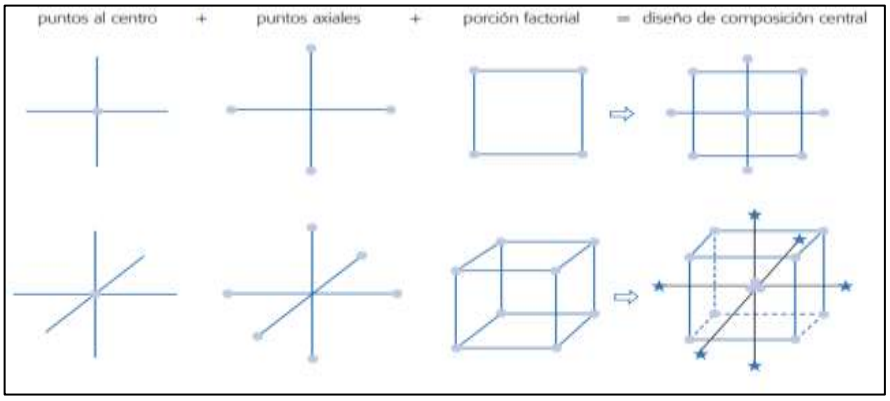

Figura 4. Representación y construcción de los DCC para k = 2 y 3 factores.

Fuente: (Gutiérrez Pulido, 2012).

3.5 Repetibilidad y reproducibilidad de un proceso

Previo al proceso de optimización, se requiere realizar mediciones y ensayos que sean reproducibles y repetibles con los resultados obtenidos. Estos estudios de repetibilidad y reproducibilidad (R&R) se basan en el análisis estadístico de las dispersiones de los resultados, para ello se puede usar el rango estadístico (mínimo – máximo), las varianzas o desviaciones estándar. Estos análisis son

importantes en un proceso porque permiten determinar si la variación observada se debe al sistema de medición usado (Paisan & Moret, 2010).

La repetibilidad se representa cuantitativamente en términos de la dispersión de los resultados, definiéndose como la proximidad de concordancia entre los resultados de mediciones consecutivas del mismo objeto de estudio, en las mismas condiciones de medición (Rey & Anaya, 2015).

Las condiciones de medición reciben el nombre de condiciones de repetibilidad; estas condiciones son: el mismo observador, el mismo procedimiento de medición, el mismo instrumento de medición, las mismas condiciones ambientales. Este procedimiento debe realizarse en un período corto de tiempo (Rey & Anaya, 2015).

Por otra parte, la reproducibilidad es definida como la proximidad de concordancia de los resultados de mediciones consecutivas del mismo objeto de estudio, en donde las condiciones de medición cambian. Las condiciones que presentan cambios pueden ser: el método de medición, operador, instrumento de medición, lugar y condiciones ambientales, tiempo (Barrera García et al., 2017).

Los análisis de reproducibilidad y repetibilidad son esenciales para garantizar la precisión y fiabilidad de la investigación científica y los procesos experimentales.

4 Materiales y métodos

4.1 Material biológico inicial

Para iniciar este estudio experimental se utilizó un cultivo de la microalga *Arthrospira platensis* que fue sembrado para la realización del trabajo experimental *"Evaluación de la producción de ficocianina a partir de Arthrospira platensis en medios de cultivos Zarrouk, Jordan y medio artesanal"*, realizado por Carranza & Cartagena (2022). El medio de cultivo utilizado se encontraba dentro de un fotobiorreactor artesanal, conformado de un Matraz de Erlenmeyer de 1 L; una bomba de oxígeno para peceras y una válvula anti-retorno, estos materiales permiten la oxigenación y agitación del medio de cultivo dentro del fotobiorreactor, y finalmente se utilizó una lámpara de luz

fría, necesaria para el desarrollo de la espirulina. La concentración inicial de biomasa fue de 1,08 g/L.

4.2 Producción de biomasa previa al inicio del diseño experimental

Para producir mayor cantidad de biomasa de espirulina, el material biológico inicial fue distribuido en partes iguales en tres matraces de Erlenmeyer de volumen de un litro cada uno. Después se preparó medio de cultivo artesanal tomando como referencia el medio de cultivo Zarrouk (Zarrouk, 1996) para el mantenimiento y crecimiento de la biomasa microalgal previo al estudio experimental. En la Tabla 5 se detallan cada uno de los componentes del medio de cultivo de mantenimiento utilizado con sus respectivas cantidades.

Tabla 5. Medio de cultivo para producción de biomasa inicial modificado de Zarrouk (1996)

Componentes	**g/L H_2O**	**Componentes**	**g/L H_2O**
$NaHCO_3$	10	K_2SO_4	1
K_2HPO_4	0,5	$MgSO_4$	0,1
KNO_3	3	$FeSO_4$	0,01
NaCl	1		

Fuente: (Zarrouk, 1996)

Elaborado por: (La autora, 2023).

Cada uno de los componentes presentados se pesaron en la balanza analítica Mettler Toledo y posteriormente fueron disueltos en 1 L de agua destilada. La solución se preparó en un frasco boeco de 1 L. Posteriormente, para obtener una solución homogénea se utilizó una placa de calentamiento a 70 °C durante 5 min y luego se procedió a autoclavar dicha solución en una autoclave horizontal Tuttnauer 3870 M.

4.3 Elaboración del diseño experimental

Para la realizar la optimización del medio de cultivo artesanal se utilizó la metodología de superficie de respuesta, empleando la técnica de diseño central compuesto (DCC). Para ello se definieron dos factores controlables, la concentración inicial (g/L) de KNO_3 y la concentración

inicial (g/L) de urea. Los factores seleccionados fueron analizados en 5 niveles que fueron codificados con los símbolos y números como se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Factores y codificación por niveles

	Codificación por niveles				
Factores	-α	-1	0	1	α
KNO_3 (g/L)	0,5	1,5	2,5	3,5	4,5
Urea (g/L)	0,01	0,08	0,15	0,23	0,31

Elaborado por: (La autora, 2023).

Se utilizó el programa estadístico *Minitab* para generar los diferentes tratamientos a realizar. Estos tratamientos se conforman de la combinación de las distintas concentraciones correspondientes a cada uno de los niveles propuestos. Para cada tratamiento se realizaron dos réplicas. Además, se hicieron 2 tratamientos de punto central (0,0). Los tratamientos generados por el programa estadístico se especifican en la Tabla 7.

Tabla 7. Tratamientos generados a partir del diseño central compuesto

	Codificación		**Concentración (g/L)**	
N° Tratamiento	**KNO_3**	**Urea**	**KNO_3**	**Urea**
1	α	0	4,5	0,15
2	0	0	2,5	0,15
3	1	-1	3,5	0,08
4	0	α	2,5	0,31
5	-1	1	1,5	0,23
6	- α	0	0,5	0,15
7	-1	-1	1,5	0,08
8	0	- α	2,5	0,01
9	1	1	3,5	0,23

Elaborado por: (La autora, 2023).

4.4 Cuantificación de biomasa previa a la inoculación en cada tratamiento

Después de transcurridas tres semanas de producción de biomasa inicial a temperatura ambiente (aproximadamente 21 °C), se realizó la cuantificación de la concentración (g/L) de biomasa de cada uno de los matraces Erlenmeyer, para ello se siguieron dos pasos: primero, extracción de biomasa de *Arthrospira platensis* y posteriormente, cuantificación mediante la técnica de peso seco.

4.4.1 Extracción de biomasa de *Arthrospira platensis*

Se extrajeron 25 mL de medio de cultivo que contenía biomasa microalgal de cada tratamiento utilizando una pipeta volumétrica. El volumen tomado pasó por un proceso de extracción por filtración al vacío. En este procedimiento se utilizó el filtrado por membrana, empleando membranas *Millipore* de 0.8 μm. Antes de realizar la filtración, se pesó la masa de la membrana; dentro de este procedimiento, se tomó con cuidado la membrana utilizando pinzas de laboratorio y se colocó en el platillo de medición de una balanza halógena y se registró el valor obtenido.

Para realizar este proceso se utilizó una bomba al vacío, membrana de filtración y un matraz Kitasato desarmable en cuyo embudo de Buchner se colocó la alícuota de 25 mL de medio de cultivo de espirulina.

4.4.2 Determinación de peso seco

Se colocó la membrana que contiene la biomasa de espirulina en el detector halógeno de humedad marca Mettler Toledo modelo HB43-S. Se anotó el valor de masa (g) obtenido en esta medición, posteriormente se realizó el siguiente cálculo matemático utilizando la Ecuación 1 .

$$Concentración\ de\ Biomasa\ (gL^{-1}) = \frac{masa\ de\ la\ membrana\ con\ biomasa\ (g) - masa\ de\ la\ membrana\ (g)}{volumen\ de\ medio\ de\ cultivo\ (L)}$$

Ecuación 1. Cálculo de la concentración de biomasa

El resultado obtenido, fue el valor de concentración inicial de biomasa para cada uno de los tratamientos. Además, los resultados a partir de este procedimiento se usaron en cálculos

posteriores para evaluar las cinéticas de crecimiento de *Arthrospira platensis* en cada uno de los tratamientos.

4.5 Cuantificación de la concentración de ficocianina

En la determinación del valor de la concentración de ficocianina de cada uno de los tratamientos se realizaron tres pasos; en primer lugar, la extracción del pigmento, seguido de la medición de su absorbancia por medio de espectrofotometría y finalmente el cálculo del porcentaje de ficocianina.

4.5.1 Extracción de ficocianina

En el proceso de extracción de este pigmento fotosintético se empleó la técnica de extracción por filtración al vacío, en donde se usó una bomba al vacío, papel filtro y un matraz Kitasato desarmable. Como primer paso, se utilizaron de 25 mL a 50 mL del contenido de cada tratamiento, el cual pasó a través de una lámina de papel filtro que retuvo la biomasa algal. Luego, con ayuda de una espátula se raspó la biomasa contenida en el papel filtro y posteriormente esta biomasa fue transferida al platillo de medición de una balanza analítica, es necesario obtener una masa entre 40 - 50 mg.

A continuación, para la preparación de la solución buffer fosfato, se elaboraron soluciones 0.2 M de NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4. Se tomaron 300 mL de solución monobásica de fosfatos (NaH_2PO_4) y se midió el pH. Luego, poco a poco se adicionó la solución dibásica de fosfato ($Na2HPO_4$) hasta alcanzar el pH deseado. El pH de la solución buffer debe encontrarse dentro del intervalo de 6.8 a 7.5. Después, en un tubo de ensayo se colocaron 10 mL de buffer fosfato y la muestra de biomasa algal previamente pesada; seguidamente, se llevó a agitar en un vortex durante 5 min. Posterior a la agitación, la muestra se refrigeró durante 24 horas en un frigorífico a 3°C. Transcurrido este tiempo, se sónico la muestra durante 40 min. Luego, se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 10 min. Los pasos para la extracción de ficocianina se pueden observar de forma gráfica en la Figura 5. Finalmente, se extrajo el sobrenadante que contiene la ficocianina que será cuantificado mediante espectrofotometría.

Proceso de extracción de ficocianina

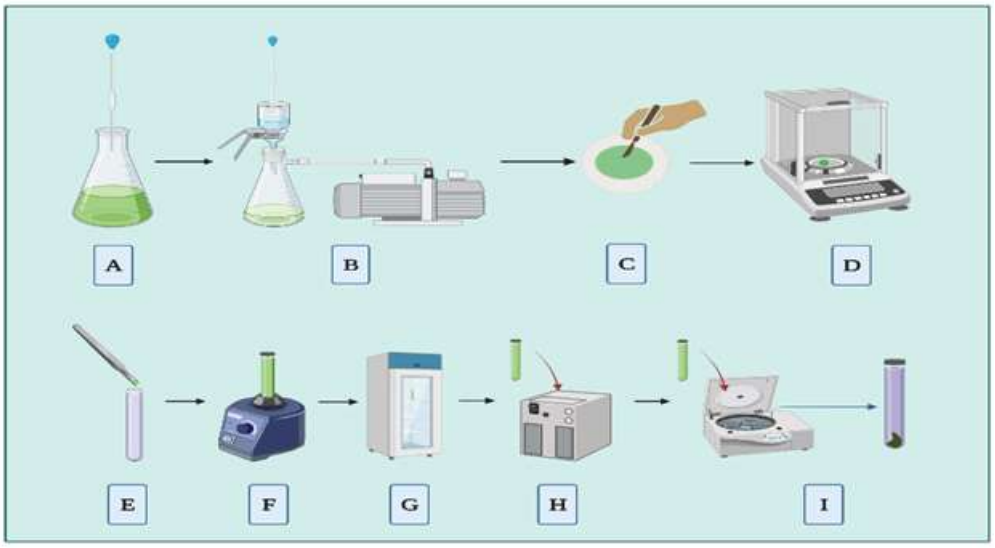

Figura 5. Proceso de extracción de ficocianina a partir de Arthrospira platensis.

A) Tomar 25 mL a 50 mL de cultivo algal. B) Extracción de biomasa algal por filtración al vacío. C) Raspado de biomasa algal contenida en el papel filtro. D) Pesado entre 40 mg a 50 mg de biomasa algal. E) Biomasa pesada en 10 mL de PBS. F) Llevar la muestra al vortex 5 min. G) Refrigerar la muestra por 24 h a 3°C. H) Sonicación de la muestra durante 40 minutos. I) Centrifugación de la muestra a 5000 rpm durante 10 min.

Elaborado por: (La autora, 2023).

4.5.2 Cuantificación de la ficocianina por espectrofotometría

Para medir la cantidad de ficocianina que se encuentra en el sobrenadante obtenido del proceso de extracción, se utilizó un espectrofotómetro. Se midió la absorbancia del sobrenadante en dos longitudes de onda específicas, 615 nm y 652 nm. Mediante la Ecuación 2 descrita por Bennett & Bogorad (1973), se midió la concentración de ficocianina.

$$[PC] = \frac{A_{615} - 0{,}474(A_{652})}{5{,}34}$$

Ecuación 2. Cálculo para la determinación de la concentración de ficocianina (mg/mL).

En donde [PC] es la concentración de ficocianina, cuya unidad de medición resultante a partir de la ecuación es de mg/mL; *A* es la absorbancia obtenida a partir de las diferentes longitudes de onda.

4.5.3 Cálculo del porcentaje de ficocianina

Para determinar el porcentaje de ficocianina presente en la muestra, se utilizó el valor de porcentaje de humedad obtenida a partir de la realización de peso seco en el proceso de determinación de la concentración de biomasa. En este paso se empleó la Ecuación 3.

$$\%\ humedad = \frac{peso\ muestra\ húmeda - peso\ muestra\ seca}{peso\ muestra\ húmeda} * 100$$

Ecuación 3. Cálculo del porcentaje de humedad de la biomasa húmeda

Se estimó el porcentaje de sólidos utilizando la Ecuación 4

$$(Sólidos) = 100\% - \%humedad$$

Ecuación 4. Cálculo del porcentaje (%) de sólidos

En el cálculo de la constante de humedad se pesaro.n entre 40 – 50mg de biomasa húmeda. Se utilizó la Ecuación 5 para determinar este valor.

$$constante\ de\ humedad = masa\ húmeda\ (mg) * \%(sólidos)$$

Ecuación 5. Cálculo de la constante de humedad.

Finalmente, para obtener el porcentaje de ficocianina se empleó la Ecuación 6

$$\%(PC) = \frac{[PC]}{constante\ de\ humedad} * 100$$

Ecuación 6. Determinación del porcentaje (%) de humedad

4.6 Cuantificación de sales minerales.

Se hicieron mediciones de nitratos, fosfato, sulfatos y sales de amoniaco, utilizando el colorímetro portátil multiparamétrico Hach-DR900. Las mediciones se realizaron tres veces por semana y se registraron los valores en la hoja de cálculo del programa *Minitab.* El fluido residual obtenido de la filtración en el proceso de extracción de biomasa algal se utilizó para realizar las cuantificaciones correspondientes de sales minerales presentes en los medios de cultivo. Para cada una de las mediciones, la muestra fue diluida con agua destilada a una proporción de 1:20.

4.6.1 Cuantificación de la concentración de nitratos

En primer lugar, se configuró el programa *355 N, Nitrato HR PP* en el colorímetro Hach DR 900. Luego, en la celda que es específica del kit del colorímetro se llenó con 10 mL de la muestra diluida, en donde se añadió el contenido de un sobre de reactivo en polvo *NitroVer5 Nitrate*. Se cubrió la muestra con el tapón correspondiente de la celda. Se agitó vigorosamente la muestra durante 1 min. Después, se esperó durante 5 min, tiempo necesario para la reacción.

A continuación, se procedió a preparar el blanco; para ello en otra celda se colocó 10 mL de muestra diluida. Se limpió cuidadosamente la celda de muestra que contiene el blanco y se la colocó dentro del soporte del colorímetro. Se presionó la opción *Zero,* como resultado la pantalla mostró *0,0 mg/L* NO_3^- *– N*. Posteriormente, se limpió la celda que contiene la muestra con el reactivo, y se insertó la celda en el portaceldas del equipo, y finalmente se presionó la opción *Read.* En la Figura 6 se visualiza de forma ilustrada el proceso de cuantificación de nitratos (Hach DR, 2023).

Proceso de cuantificación de nitratos (NO_3^- - N)

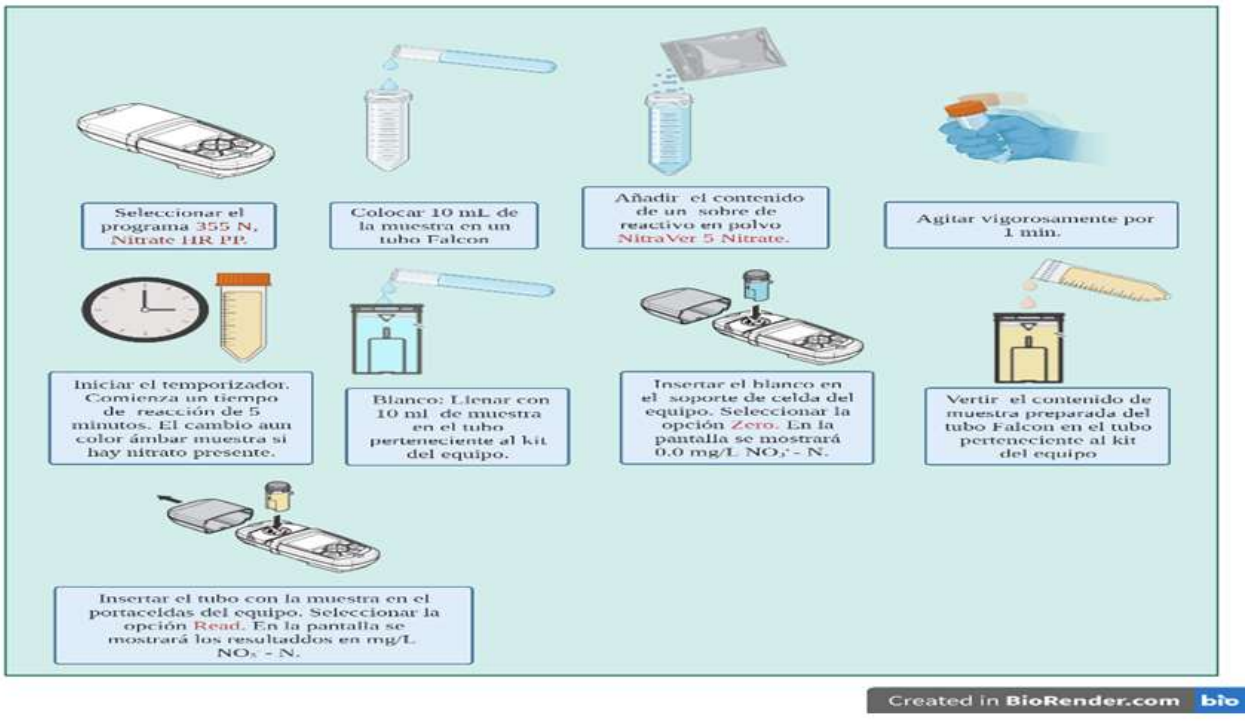

Figura 6. Proceso de cuantificación de nitratos (NO_3^-) utilizando el equipo Hach – DR 900.

Fuente: (Hach DR, 2023).

Elaborado por: (La autora, 2023).

4.6.2 Cuantificación de la concentración de fosfatos

Para iniciar, se seleccionó el programa *490 P React. PP* en el colorímetro Hach DR 900. Luego en una celda se colocó 10 mL de muestra diluida y adicionamos el contenido de un sobre del polvo *PhosVer3 Phosphate.* Se cubrió la muestra con el respectivo tapón de la celda y se agitó vigorosamente durante 30 s. Se dejó reposar la muestra durante 2 min que corresponde al tiempo de reacción.

A continuación, se preparó el blanco utilizando 10 mL de muestra diluida únicamente. Para concluir con la cuantificación, se limpió cuidadosamente cada celda (blanco y muestra). En lectura del blanco, se insertó la celda correspondiente en el colorímetro y se presionó la opción *Zero*, y después se insertó la celda con la muestra y se presionó la opción *Read.* El resultado obtenido se mostró en *mg/L* PO_4^{3-} (Hach DR, 2023). Los pasos del proceso descrito se reflejan en la Figura 7.

Proceso de cuantificación de fosfatos (PO_4^{3-})

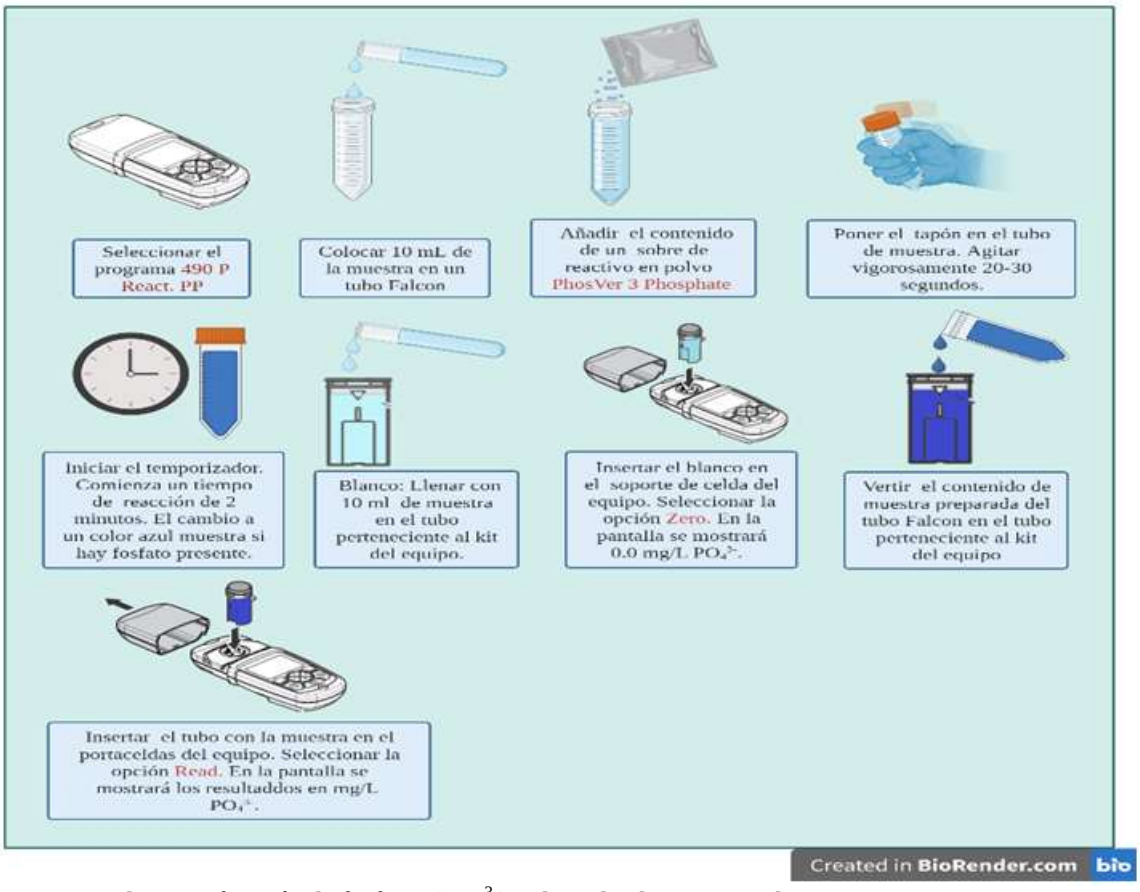

Figura 7. Proceso de cuantificación de fosfatos (PO_4^{3-}) utilizando el equipo Hach – DR 900.

Fuente: (Hach DR, 2023).

Elaborado por: (La autora, 2023).

4.6.3 Cuantificación de la concentración de sulfatos

En el colorímetro Hach DR 900, se eligió el programa *680 Sulfate,* para realizar la medición de sulfatos en cada una de las muestras. Se llenó una celda con 10 ml con muestra diluida, y se añadió el contenido de un sobre de polvo de *SulfaVer 4.* Se agitó la muestra, y se esperó durante 5 min que ocurra la respectiva reacción. Después se preparó el blanco en otra celda que fue llenada con 10 mL de muestra.

Para realizar la cuantificación, después de transcurridos los 5 min de reacción, se limpió cuidadosamente la celda con el blanco y se la insertó en el equipo, y se presionó la opción *Zero.* Para finalizar, se limpió con delicadeza la celda con la muestra preparada y se la colocó en el portaceldas del equipo, se presionó la opción *Read.* Los resultados se presentaron en *mg/L* SO_4^{2-} (Hach DR, 2023). En la Figura 8 se muestran ilustrados los pasos del proceso de cuantificación de sulfatos.

Proceso de cuantificación de sulfatos (SO_4^{2-})

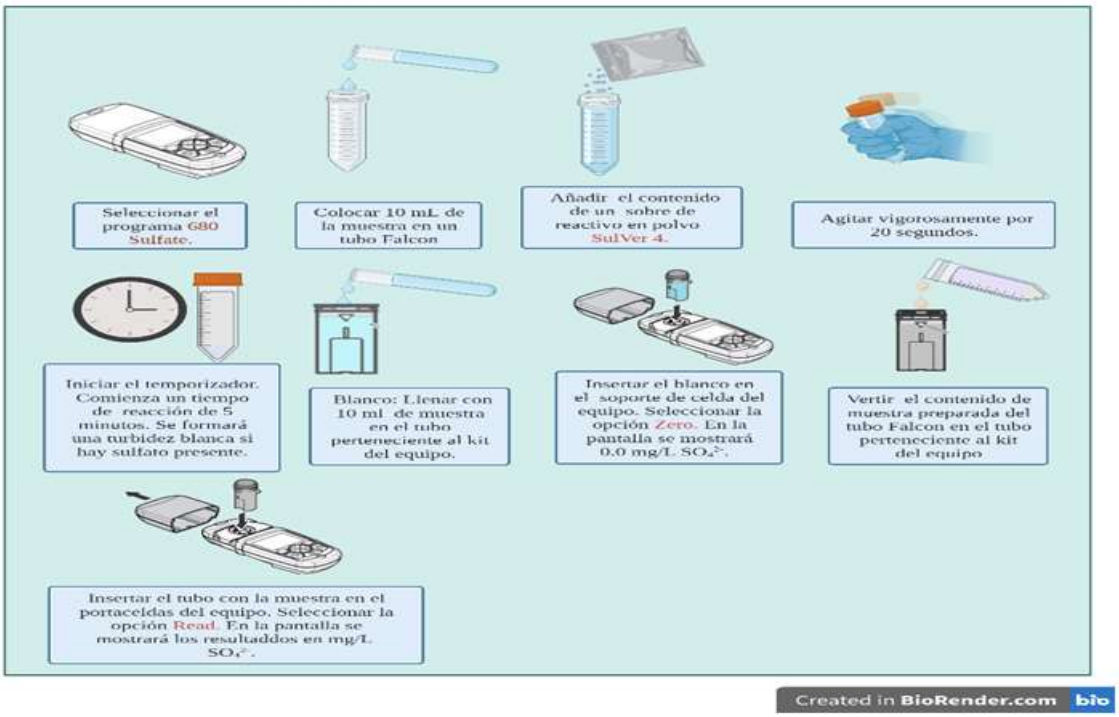

Figura 8. Proceso de cuantificación de sulfatos (SO_4^{2-}) utilizando el equipo Hach – DR 900.

Fuente: (Hach DR, 2023).

Elaborado por: (La autora, 2023).

4.6.4 Cuantificación de sales de amoniaco

Para iniciar, se configuró el programa 385 N, Ammonia, Salic. Luego se preparó el blanco, para ello se llenó una celda con 10 mL de agua destilada. En una segunda celda, se utilizó 10 mL de muestra diluida, en donde se le añadió el contenido de un sobre de polvo de salicilato de amoniaco, y se agitó hasta disolver completamente el reactivo. Luego, la muestra preparada estuvo en reposo durante 3 min correspondiente al tiempo de reacción del reactivo. Posteriormente, se agregó el contenido de un sobre de polvo de cianurato de amoniaco a la celda con la muestra, se agitó hasta obtener una solución homogénea y se mantuvo en reposo durante el tiempo de reacción de 15 min; se observó un cambio de color a verde. Finalmente, la celda que contiene el blanco se insertó en el portaceldas del equipo y se presionó la opción Zero, seguidamente se limpió la celda con la muestra preparada y se colocó en el soporte de la celda del colorímetro, y se presionó la opción Read. El resultado obtenido se mostró en mg/L NH_3 –N. La ilustración de proceso se muestra en la Figura 9 (Hach DR, 2023).

Proceso de cuantificación de amonio (NH_3 – N)

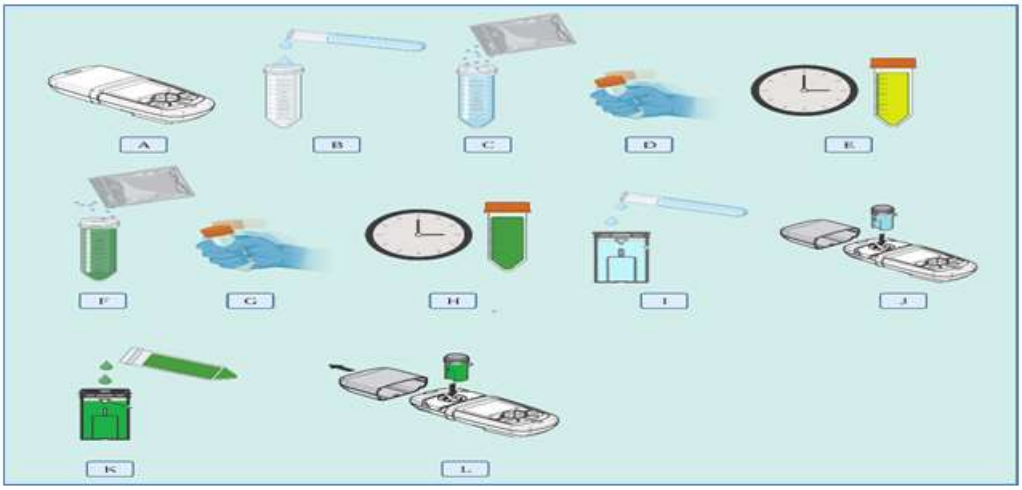

Figura 9. Proceso de cuantificación de amoniaco (NH_3 - N) utilizando el equipo Hach – DR 900.

A) Seleccionar el programa *385 N, Ammonia, Salic.* B, C, D, E) 10 mL de muestra, adicionar el reactivo salicilato de amoniaco; agitar por 1 min. Tiempo de reacción de 3 min. F, G, H) Adicionar cianurato de amoniaco, agitar la muestra. Esperar 15 min. I, J) Blanco: Segunda celda con 10 ml de muestra, insertar en el portaceldas y seleccionar la opción Zero. K, L) Tubo con la muestra preparada, insertar en el colorímetro y seleccionar la opción Read.

Fuente: (Hach DR, 2023).

Elaborado por. (La autora, 2023).

4.7 Análisis estadístico

Después de la recolección de datos se empleó un análisis estadístico para descubrir las tendencias en el crecimiento de la biomasa de *A. platensis* y la producción de ficocianina. En primer lugar, se realizaron las operaciones matemáticas correspondientes para cada una de las muestras con su respectivo factor de dilución.

Luego, se graficaron líneas de tendencia para cada uno de los tratamientos. Estas líneas representaban el crecimiento de biomasa, producción de ficocianina y consumo de sales minerales durante el período de estudio. A continuación, se realizó la determinación del área bajo la curva de todas las líneas de tendencias.

Para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de los resultados en lo que respecta a la producción de ficocianina, se utilizó 5.6 mg de compuesto de ficocianina patrón en 10 mL de buffer fosfato; en este procedimiento se midió las absorbancias en las longitudes de onda de 615 nm y 652 nm. A continuación, se procedió a realizar el cálculo de concentración de ficocianina utilizando la Ecuación 2. Posteriormente, se determinó el porcentaje de ficocianina patrón con el que se realizó el cálculo de error relativo para medir la reproducibilidad del proceso.

La técnica del área bajo la curva, es una herramienta matemática usada en estadística para reducir el número de datos, en donde existen varias lecturas o evaluaciones a lo largo de un período de tiempo (Navarro Flores, 2012). Para calcular el área bajo la curva, se utilizó la geometría de trapecios como se observa en la Figura 10.

Determinación del área bajo la curva: geometría de trapecios

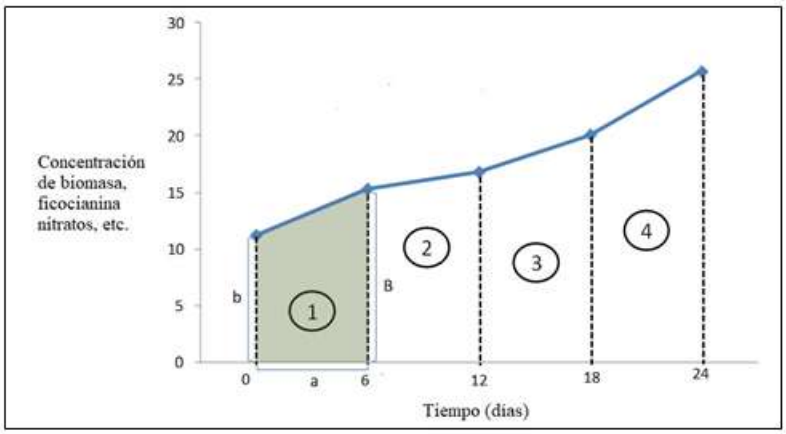

Figura 10. Geometría de trapecios para la determinación del área bajo la curva.

Fuente: (Navarro Flores, 2012).

Se observa que bajo la línea de tendencia con respecto al tiempo se forman trapecios; por consiguiente, para calcular el área de cada uno de los trapecios se utiliza la Ecuación 7. Finalmente, para determinar el área total se suma cada una de las áreas de los trapecios formados.

$$Área\ del\ trapecio = \frac{(B + b) * a}{2}$$

Ecuación 7. Cálculo del área de un trapecio

Los resultados se encuentran en unidades experimentales cuadradas u^2, que representan el área bajo la curva formada por cada corrida experimental durante 24 días. La recolección de datos se realizó 5 veces (día: 0, 6, 12, 18, 24) y se obtuvo un valor correspondiente al área bajo la curva formada durante los 24 días. Con los datos obtenidos a partir de realizar el cálculo del área bajo la curva, se realizó el estudio de superficie de respuesta; para ello se utilizó el programa estadístico *Design Expert* y *Minitab.* Se validó la calidad de la ecuación de regresión cuadrática, para ello se empleó un análisis de varianza ANOVA, y de esta forma se evaluaron los valores de significancia generados por el programa estadístico. Se determinó si los valores de significancia p, F eran satisfactorio para el modelo matemático utilizado. Se verificó la calidad del modelo matemático, para ello se consideró el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación de

ajuste (R^2_{adj}). Se examinaron las gráficas de residuos para corroborar la calidad del modelo de ajuste escogido.

Una vez realizado el estudio de calidad del modelo matemático, se procedió a graficar las superficies de respuesta y la gráfica de contornos para evaluar los efectos de los factores (urea y KNO_3) en las variables de respuesta, el crecimiento de biomasa y la producción de ficocianina.

Después, mediante el análisis de superficies y con el empleo de software estadístico se optimizaron los factores controlables (urea y KNO_3) con el fin de conseguir la mejor respuesta de las variables dependientes (biomasa y ficocianina).

Finalmente, se establecieron gráficas de consumo de sales minerales (nitratos, fosfatos, sulfatos y amoniaco) y se realizaron estudios de ANOVA para determinar la relación entre los factores y la concentración de estos nutrientes.

5 Resultados y discusión

El presente estudio optimizó la concentración de urea y KNO_3 para maximizar la producción de biomasa de *Arthrospira platensis* y el aumento del porcentaje de ficocianina utilizando un medio de cultivo artesanal. El diseño experimental elegido fue el diseño central compuesto (DCC) que incluye 9 tratamientos y dos réplicas por tratamiento, para un total de 18 corridas experimentales. Este enfoque tiene como objetivo observar el comportamiento de las dos variables de respuestas elegidas (producción de biomasa de espirulina y porcentaje de ficocianina), frente a la interacción de dos fuentes de nitrógeno (KNO_3 y urea) mediante la generación de gráficas de superficie de respuesta.

De acuerdo con Kasina et al. (2020), afirman que el uso de un DDC es comúnmente utilizado en criterios de optimización por la facilidad de su empleo y permite la estimación de todos los parámetros en un modelo completo de segundo orden; este modelo es altamente eficiente. En la realización del diseño de superficie de respuesta, se escogió la propiedad de giratorio; en procesos de optimización, un diseño giratorio es importante porque tiene la capacidad de extraer mayor cantidad de información sobre las variables dependientes y la menor cantidad de incertidumbre en la predicción de respuestas (Kasina et al., 2020). Además, se analizó el consumo de sales minerales, como los nitratos, fosfatos, sulfatos y amoniaco, en cada tratamiento; éstos son nutrientes esenciales en el crecimiento de biomasa y producción de ficocianina. En la Tabla 8 se visualizan la combinación de los factores urea y KNO_3, y sus respectivos resultados, es decir el valor del área bajo la curva formada durante el periodo experimental (24 días) para cada uno de los tratamientos. En el Anexo 1 se visualiza detalladamente los resultados del área bajo la curva de cada corrida experimental.

Tabla 8. Diseño experimental DCC y resultados (promedio de réplicas)

Tratamientos	Unidades codificadas		Unidades originales		Resultados (área bajo la curva)	
	Urea	KNO_3	Urea (g/L)	KNO_3 (g/L)	Biomasa (u^2)	Ficocianina (u^2)
1	0.000	1.414	0.150	4.500	12.810	2.142
2	0.000	0.000	0.150	2.500	10.830	1.279
3	-1.000	1.000	0.080	3.500	9.780	1.352
4	1.414	0.000	0.310	2.500	0.900	0.036
5	1.000	-1.000	0.230	1.500	1.020	0.036
6	0.000	-1.414	0.150	0.500	10.650	1.665
7	-1.000	-1.000	0.080	1.500	8.580	1.449
8	-1.414	0.000	0.010	2.500	10.650	1.786
9	1.000	1.000	0.230	3.500	0.630	0.036

Elaborado por: (La autora, 2023).

5.1 Tendencia en el crecimiento de biomasa de *Arthrospira platensis* y producción de ficocianina.

Usando la metodología de superficie de respuesta a partir de un diseño central compuesto, se examinó los efectos de las distintas concentraciones de urea y KNO_3, frente al comportamiento de *Arthrospira platensis* y la producción de ficocianina. De acuerdo con los resultados experimentales, los valores de biomasa y la producción de ficocianina oscilaron entre 0.600 u^2 y 13.200 u^2, 0.036 u^2 y 2.424 u^2 respectivamente. Durante el periodo de estudio, el porcentaje de ficocianina fluctuó entre 1.58% y 17.51%.

En la Tabla 8 se evidencia que el tratamiento 1 (experimentos 1 y 10) proporcionó la concentración de biomasa más alta, con un valor promedio de las réplicas de 12.81 u^2, seguido por el tratamiento 2 cuyos experimentos 2 y 11 proporcionaron un valor promedio de la concentración de biomasa de 10.83 u^2. Mientras que los valores más bajos fueron obtenidos de los tratamientos 4, 5 y 9, con los valores de 0.9 u^2, 1.02 u^2 y 0.63 u^2 respectivamente. Los valores mencionados fueron obtenidos en el día 0 de medición, que corresponden a los tratamientos 4, 5, 9. En las mediciones posteriores (día 6, 12, 18, 24) no existió crecimiento y murió la biomasa inoculada en el día 0. El tratamiento 1 estaba compuesto de 4.5 g/L de KNO_3 y 0.010 g/L de urea. En el estudio realizado por Gómez et al. (2021), se señaló que al utilizar 2.5 g/L de nitratos se reportó un rendimiento máximo de biomasa de 3.5 g/L, esto puede atribuirse a la mayor disponibilidad de nitrógeno en el medio. En el estudio realizado por Castro et al., (2015), se menciona que el excedente de nitrógeno en los medios de cultivo se almacena en forma de compuestos orgánicos, como las proteínas, esta evidencia se corroboró con el aumento de la producción de la proteína ficocianina en el tratamiento 1.

El nitrógeno es un elemento imprescindible para el cultivo de *A. platensis,* debido a su gran influencia en el desarrollo de esta microalga, dependiendo de la cantidad, disponibilidad y tipo de fuente de nitrógeno. La fuente estándar de nitrógeno son los nitratos; también se ha utilizado como fuente de nitrógeno al proveniente del amonio, por ser una alternativa menos costosa (Z. Li et al., 2022). La muerte de la biomasa inoculada se puede atribuir a las concentraciones elevadas de urea (0.23 g/L y 0,31 g/L), que es una fuente de amoniaco. Se han reportado diversos valores de concentración de urea que inhiben el crecimiento *A. platensis,* entre estos valores se encuentran el reportado por Mateucci (2018) en donde la concentración inhibitoria de urea es de 0.88 g/L; mientras que en la investigación realizada por Kumari et al. (2015) se observó una concentración de inhibición de 1.5 g/L. Este efecto en inhibitorio aumenta a medida que el pH del medio incrementa.

En la Figura 11 se visualiza las líneas de tendencia de crecimiento de biomasa (g/L) con respecto al periodo de estudio. Cada curva obtenida es resultado de la media de las réplicas por tratamiento.

Además, en el Anexo 2 se observan los resultados de crecimiento de biomasa en cada medición (días: 0, 6, 12, 18, 24).

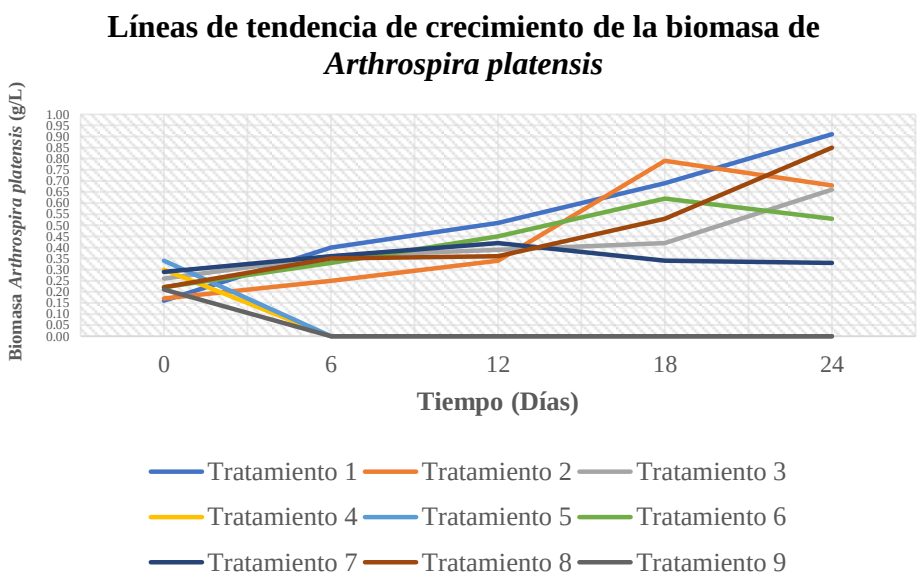

Figura 11. Líneas de tendencia de crecimiento de la biomasa de *Arthrospira platensis.*

Elaborado por: (La autora, 2023).

En lo referente a la producción de ficocianina, de igual manera, el tratamiento 1, presentó la mayor área bajo la curva, con un valor promedio de réplicas de 2.142 u^2. En estos experimentos (1 y 10) el porcentaje promedio de ficocianina aumentó desde 1.24% a 15.73%. Sin embargo, los tratamientos 4, 5, y 9 no presentaron producción de ficocianina ya que en el día 6 se observa que la biomasa inoculada murió. La ficocianina, un pigmento soluble en agua tiene estrecha relación con la concentración de biomasa, en donde, varios factores como, la disponibilidad de nutrientes, el pH, la salinidad, la irradiación de luz, la velocidad de agitación, afectan el crecimiento y la acumulación de este pigmento en las microalgas (Khazi et al., 2018) . En el estudio realizado por Castro et al. (2015), en donde se realizó la optimización un medio de cultivo Zarrouk modificado (Zarrouk, 1996), en donde se utilizaron diferentes concentraciones de nitrato de sodio y bicarbonato de sodio, se demostró que al emplear 2.5 g/L de nitratos se obtuvo una concentración de ficocianina de 17.9%; esto refleja que los resultados obtenidos se asemejan con estudios similares realizados. Como se había mencionado, los tratamientos 4, 5 y 9, no presentaron producción de biomasa y consecuentemente producción de ficocianina; según Mateucci (2018) este acontecimiento puede

atribuirse a la presencia de amoníaco en concentraciones superiores a 2 mM (0.034 g/L) en el medio de cultivo siendo causante de toxicidad. Además, se demostró que altas concentraciones de amoníaco (NH_3) provoca la inhibición del sistema fotosintético de las cianobacterias y por ende, afecta negativamente en la producción de biomasa (Z. Li et al., 2022). En la Figura 12 se representa la tendencia de crecimiento de producción ficocianina (%) con respecto al periodo de estudio.

Cada curva de crecimiento es el resultado de la media de las réplicas por tratamiento; las líneas de tendencia correspondientes a los tratamientos 4, 5 y 9 se encuentran sobrepuestas, por presentar resultados iguales. Los resultados de concentración y porcentaje de ficocianina para cada una de las mediciones en el periodo experimental se reflejan en el Anexo 3 y Anexo 4.

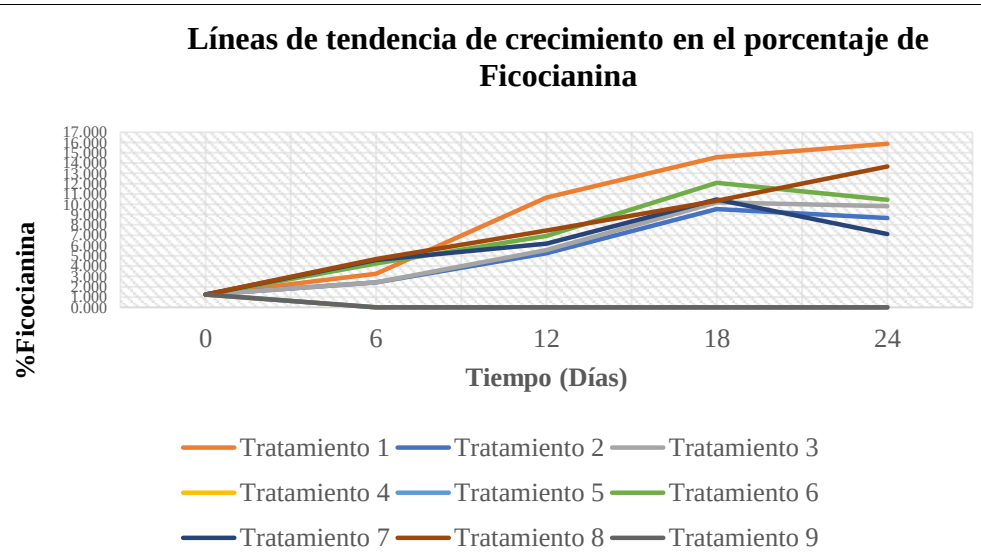

Figura 12. Líneas de tendencia de crecimiento en el porcentaje (%) de ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

5.2 Reproducibilidad con respecto al porcentaje de ficocianina

Después de realizada la medición espectrofotométrica y la realización de los cálculos correspondientes, se determinó el porcentaje de ficocianina de la muestra patrón de 5.37 %. El proveedor de ficociania reportó que el pigmento fotosintético proporcionado posee un porcentaje de 5 % de ficocianina; con este valor se realizó el análisis comparativo y se determinó el error relativo, siendo éste de 0.07%. A partir de este valor de comprobó la reproducibilidad del proceso de extracción y cuantificación de ficocianina. Según Paisan & Moret (2010) tener un valor

adecuado de reproducibilidad (< 10%) en los datos se debe a un equipo correctamente calibrado, un buen entrenamiento del operador, y que no existieron cambios en las condiciones ambientales y de medición.

5.3 Modelos de regresión cuadrática y análisis de varianza (ANOVA)

A partir de los parámetros estimados y mediante el diseño central compuesto se obtuvieron las ecuaciones de regresión cuadráticas completas para la producción de biomasa y ficocianina, detalladas en la Tabla 9. Se utilizó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para generar los modelos matemáticos cuadráticos.

Tabla 9. Modelos de regresión cuadrática ajustada

Variables de respuesta	Ecuación de regresión cuadrática ajustada.
Biomasa	Biomasa (u^2) = 10.83 - 3.812 Urea (g/L) + 0.483 KNO_3 (g/L) - 3.46 Urea (g/L)*Urea (g/L) - 0.49 KNO_3 (g/L)*KNO_3 (g/L) - 0.40 Urea (g/L)*KNO_3 (g/L) Ecuación 8. Modelo de regresión cuadrática ajustada para biomasa
Ficocianina	Ficocianina (u^2) = 1.279 - 0.651 Urea (g/L) + 0.072 KNO_3 (g/L) - 0.356 Urea (g/L)*Urea (g/L) + 0.140 KNO_3 (g/L)*KNO_3 (g/L) + 0.024 Urea (g/L)*KNO_3 (g/L) Ecuación 9. Modelo de regresión cuadrática ajustada para ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Los coeficientes con signo positivo en el modelo ajustado significan que la variable puede mejorar la respuesta. Por el contrario, el signo negativo en la ecuación de regresión implica la capacidad de la variable para reducir la respuesta (Zhou et al., 2023). La Ecuación 8 y Ecuación 9 indicaron que el aumento en la concentración de urea afecta negativamente en el crecimiento de biomasa microalgal; dicha afección es directamente proporcional en la producción de ficocianina. Particularmente, el uso de urea como fuente de nitrógeno genera una ganancia energética por su hidrólisis a amoníaco en medio alcalino, y de esta forma es fácilmente asimilable por *A. platensis.*

Por otra parte, cuando las fuentes de nitrógeno son los nitratos, la espirulina necesita reducirlo a nitrito, esta reacción es catalizada por la enzima nitrato reductasa, y por medio de la enzima nitrito reductassa convertirlo en amoníaco. Este proceso es altamente energético por lo que el alga prefiere utilizar nitrógeno reducido (urea). Sin embargo, si las concentraciones de urea son elevadas ocasiona toxicidad y puede conducir a la inhibición del crecimiento de la biomasa microalgal (Converti et al., 2006).

Con respeto a la presencia de KNO_3, el modelo cuadrático refleja que, a mayor concentración de este componente, las variables de respuesta se comportan de manera positiva, es decir, se predice un aumento de la biomasa de *Arthrospira platensis* y consecuentemente el incremento de la producción de ficocianina. Según Ruliaty et al. (2022), el KNO_3 se usa simultáneamente con la urea como fuente de nitrógeno, ya que mantiene al microorganismo en una condición estable y así lograr aumentar la concentración celular y la productividad de *A. platensis*.

Además, en el estudio se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizado en el diseño de ajuste del modelo para la identificación de los términos estadísticamente significativos. El análisis ANOVA es un herramienta estadística importante ya que permite determinar si existe diferencia significativa entre variables dependientes y las variables de respuesta (Smalheiser, 2017). En la Tabla 10 y Tabla 11 se muestran los resultados del análisis ANOVA para las dos variables de respuesta estudiadas. La distribución F es un análisis estadístico que permite probar la diferencia entre los grupos estudiados; se utiliza para probar la hipótesis nula (H_0) que significa que las varianzas o medias de dos o más grupos son iguales (Mohr et al., 2022). Con respecto a la producción de biomasa, se encontró que el análisis de varianza proporciona un valor de F = 11.99, correspondiente al modelo de ajuste; este valor determina que el modelo presentado es significativo estadísticamente. Al determinar el valor de $F_{crit\ (0.05;\ 4;\ 13)}$ se obtuvo como resultado el valor 3.18 que es inferior al F del modelo, por consiguiente, se rechazó la H_0 (el modelo no es significativamente estadístico) y se aseguró que los resultados obtenidos son significativos con un 95% de nivel de confianza en la búsqueda de maximizar la tasa de crecimiento de *Arthrospira platensis*.

Tabla 10. Análisis de varianza ANOVA para el modelo de regresión de ajuste de biomasa

Fuente		GL	SC Sec.	MC Ajust.	Contribución	Valor F	Valor p
Modelo		5	336.24	67.25	76.47%	11.99	0.0004
	Urea	1	232.54	232.54	52.89%	41.46	<0.0001
	KNO_3	1	3.73	3.73	0.85%	0.6658	0.4318
	Urea*KNO_3	1	1.26	1.26	0.29%	0.2254	0.6443
	Urea*Urea	1	69.85	69.85	22.13%	12.45	0.0047
	KNO_{3*} KNO_3	1	1.38	1.38	0.31%	0.2465	0.6293
Error		11	61.69	0.1810	23.53%		
	Falta de ajuste	3	21.20	0.1109	13.56%	1.40	0.3129
	Error puro	8	40.49	0.2073	9.97%		
Total		17	12.64		100.00%		

Elaborado por: (La autora, 2023).

El valor –p es una medida estadística que permite validar la $H_{0.}$ Este valor se encuentra en un intervalo entre 0 y 1. Cuanto menor sea el valor p, es más probable que los resultados obtenidos sean estadísticamente significativos y se deban al azar (Dahiru, 2008). En el presente estudio, el ANOVA proporcionó un valor p = 0.0004 es bastante menor al valor de α (0.05), por lo que se rechaza la H_0 y se evidencia que los términos pertenecientes al modelo son significativos. Sin embargo, cabe resaltar que los términos correspondientes a KNO_3*KNO_3 y la interacción entre factores (Urea* KNO_3), no presentan significancia en el modelo, por lo tanto, se infiere que la concentración de KNO_3 no influye de manera significativa en el crecimiento de biomasa.

Por otra parte, el valor p de falta de ajuste de 0,3129 implica que la falta de ajuste no es significativa, de esta forma se determina que el modelo elegido es confiable, y se puede utilizar para optimizar la variable de respuesta mencionada.

A continuación, se interpretaron los resultados obtenidos del análisis de ANOVA para la producción de ficocianina que se encuentran en la Tabla 11. Al comparar el valor $F_{crit\ (0.05\ ;\ 4;\ 13)}$

=3.18 y el valor F de 9.85 del modelo, se llegó a la conclusión de que el modelo era significativo. Adicionalmente, el modelo tenía un valor – p inferior al valor de significancia de confianza α ($0.0009 < \alpha$). El término *Urea* fue significativo en el modelo, es decir tuvo influencia en la variable de respuesta. Por el contrario, la concentración de KNO_3 no mostró efectos significativos en la producción de ficocianina ($p > \alpha$). Además, se realizó la verificación de la validez del modelo utilizando el análisis de falta de ajuste, que indicó que el modelo se ajustaba con precisión a los datos, con un valor de p = 0.671 superior a 0,05.

Tabla 11. Análisis de varianza ANOVA para el modelo de regresión de ajuste para ficocianina

Fuente		**GL**	**SC Sec.**	**MC Ajust.**	**Contribución**	**Valor F**	**Valor p**
Modelo		5	8.91	1.78	70.51%	9.85	0.0009
	Urea	1	6.77	6.77	53.57%	37.40	<0.0001
	KNO_3	1	0.0833	0.0833	0.66%	0.4599	0.5117
	Urea*KNO_3	1	0.0048	0.0048	0.04%	0.0263	0.8742
	Urea*Urea	1	0.7392	0.7392	15.34%	4.08	0.0683
	KNO_{3*} KNO_3	1	0.1135	0.1135	0.90%	0.6272	0.4451
Error		11	1.99	0.1810	29.49%		
	Falta de ajuste	3	0.3327	0.1109	16.34%	0.5350	0.6712
	Error puro	8	1.66	0.2073	13.15%		
Total		17	12.64		100.00%		

Elaborado por: (La autora, 2023).

Los valores de significancia p y F revelaron que los modelos utilizados podrían proporcionar datos experimentales fiables.

5.3.1 Calidad del ajuste

Para verificar la calidad del ajuste de los modelos especificados en la , se determinaron los coeficientes de determinación (R^2) y de determinación ajustado (R^2_{aj}), valores que permiten reflejar la precisión con la que se predicen los valores de las respuestas y qué tan bien los modelos de

regresión describen los datos (Pulido et al., 2012). En la Tabla 12 se registran los coeficientes de determinación (R^2) para cada uno de los modelos cuadráticos ajustados: modelo del crecimiento de biomasa y modelo de la producción de ficocianina, con resultados de 0.845 y 0.817 respectivamente. También se obtuvo el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) para los modelos cuadráticos mencionados; el valor del coeficiente para el crecimiento de biomasa fue de 0.775, y en lo que respecta a la producción de ficocianina se obtuvo el valor de 0.734. De acuerdo con Pulido et al. (2012), el valor de R^2 y R^2_{aj} indican la calidad del ajuste del modelo ya que explican la variación de los datos; un valor superior a 0.7 en ambos coeficientes demuestran que el modelo tiene un ajuste satisfactorio. Los valores obtenidos de cada coeficiente validaron la confiabilidad de los modelos en la estimación de las concentraciones óptimas requeridas de urea y KNO_3 para maximizar el crecimiento de biomasa y la producción de ficocianina.

Tabla 12. Coeficientes R^2 y R^2_{aj} de los modelos de regresión cuadrática.

Modelo ajustado para biomasa		**Modelo ajustado para ficocianina**	
$\mathbf{R^2}$	0.84	R^2	0.8174
$\mathbf{R^2_{aj}}$	0.7745	R^2_{aj}	0.7343

Elaborado por: (La autora, 2023).

Además, se evaluaron las gráficas de residuos para determinar si el modelo presentó un ajuste satisfactorio. En la Figura 13, las gráficas A y B corresponden a las gráficas de probabilidad normal de residuos de los modelos descritos en la Tabla 12.

La gráfica de probabilidad normal es utilizada para evaluar si un conjunto de datos sigue una distribución normal. Esta gráfica se utiliza para identificar desviaciones relevantes, valores atípicos, curtosis (Boylan & Cho, 2012). Se observó en la Figura 13, tanto en la gráfica a y b que los residuos se encuentran distribuidos de manera uniforme alrededor de la línea normal (línea diagonal), es decir se presentó curtosis estadística o también conocida como valor 0, por lo que no existe un sesgo sistemático en ninguna dirección. Este gráfico sugiere que el modelo utilizado refleja correctamente la variabilidad de los datos, por lo tanto, no existen errores sistemáticos en la

estimación de los mismos. Otra herramienta gráfica que permite la evaluación de residuos de un modelo estadístico es la gráfica de residuos vs. predichos. Mediante esta gráfica se podrá determinar si el modelo escogido se encuentra ajustado idóneamente, para ello los valores deben encontrarse aleatoriamente con respecto a la línea central; también este gráfico permite analizar la homocedasticidad del modelo, en donde se evalúa que el término de error no varíe mucho a medida de que cambia el valor de los factores predictorios (Yang et al., 2019).

Gráfica de probabilidad Normal de residuos

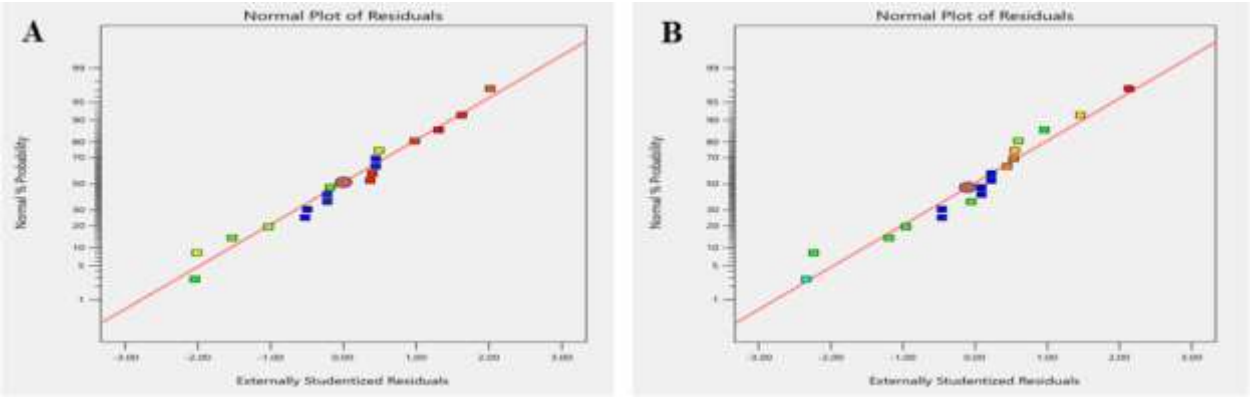

Figura 13. Gráficas de probabilidad Normal para residuos.

A) Gráfica para residuos de biomasa. B) Gráfica para residuos de ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Gráficas de residuos vs. Predichos

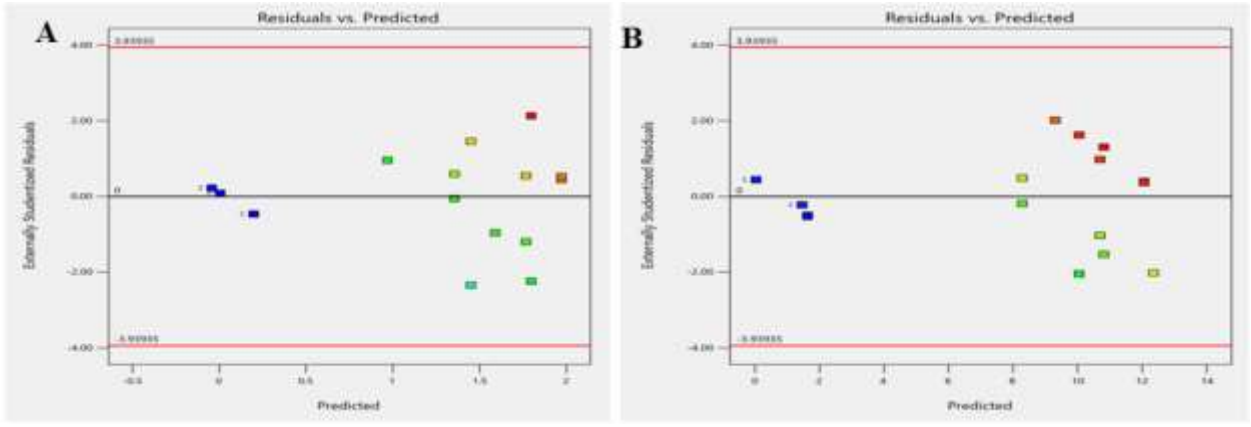

Figura 14. Gráficas de residuos vs. predichos.

A) Gráfica de residuos vs. predichos para el modelo de biomasa. B) Gráfica de residuos vs. predichos para el modelo de ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Al analizar las gráficas A y B obtenidas presentadas en la Figura 14, se dedujo que el modelo estadístico ajustado presentó heterocedasticidad. Esto pudo ocurrir por varias razones, por ejemplo, se utilizó un rango amplio entre las variables aumentando la posibilidad de perder homocedasticidad, como también la presencia de valores nulos tanto para el crecimiento de biomasa como para la producción de ficocianina.

5.4 Análisis de la superficie de respuesta de biomasa

En la Figura 15 se muestra una gráfica de efectos principales y una gráfica de Pareto estandarizada, con el fin de demostrar la influencia de los factores y sus interacciones, en donde se utilizó el valor de significancia estadística p = 0.05. También en la gráfica se observa una línea vertical que se utilizó para evaluar cuáles efectos son estadísticamente significativos; por lo que, cualquier barra que se extienda más allá de la línea corresponde a efectos que son estadísticamente significativos (Alkiayat, 2021).

Gráfica de efectos principales y gráfica de Pareto para biomasa

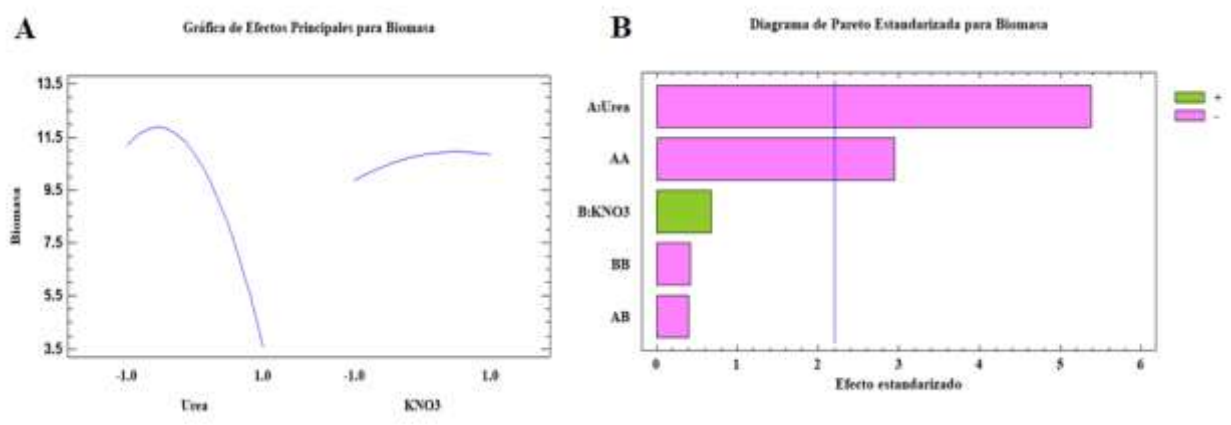

Figura 15. Gráficas de efectos principales y Pareto para biomasa.

Elaborado por: (La autora, 2023).

De acuerdo a la Figura 15.B, el resultado señaló que el efecto de la urea es estadísticamente significativo con un 95% de confianza, con un impacto negativo frente al crecimiento de biomasa microalgal. El factor KNO_3 (B) presentó un efecto positivo, pero no tuvo significancia estadística. Los efectos negativos de los factores se clasificaron de la siguiente manera: urea (A) > urea * urea

(AA) > [KNO_3 * KNO_3 (BB) = urea * KNO_3 (AB). En el presente estudio, se utilizaron 5 niveles en la concentración de urea y KNO_3 para examinar su efecto en el crecimiento de biomasa

Otra gráfica en este análisis de optimización es la gráfica de efectos principales, que muestra el efecto de los factores frente a la variable de respuesta deseada. Esta gráfica representa el resultado medio para cada valor de cada una de las variables independientes (Antony, 2014); por consiguiente, en la Figura 15.A, se visualiza que el aumento de la concentración de urea, provoca la disminución del crecimiento de biomasa.

5.4.1 Superficie de respuesta y curvas de contorno para biomasa

La metodología de superficie de respuesta, es una herramienta estadística y matemática, comúnmente empleada en la optimización de proceso, con el fin de encontrar una solución, es decir la configuración óptima de los factores, en este caso (urea y KNO_3), que darán como resultado la mejor respuesta de las variables dependientes (biomasa). Este gráfico tridimensional permite explorar los efectos de las variables independientes sobre las variables de respuesta (Sarabia & Ortiz, 2009). Además, un gráfico de contorno es un gráfico bidimensional que muestra la relación entre dos variables independientes (factores) y la variable de respuesta estudiada. Este gráfico se crea trazando una serie de curvas o líneas que representan la superficie de respuesta en dos dimensiones (Pulido et al., 2012) .

Para visualizar los efectos principales y los resultados de la interacción de las variables utilizadas en el crecimiento de la biomasa de *Arthrospira platensis*, se utilizó el gráfico de superficie de respuesta y una gráfica de contornos. En la Figura 16 y Figura 17 se visualizaron la gráfica de superficie de respuesta y la gráfica de curvas de contorno, que representan la concentración de urea y KNO_3 frente a la variable de respuesta (crecimiento de biomasa), los gráficos fueron diseñados en el software estadístico *Design expert*. Se destacó que la biomasa disminuyó gradualmente a medida que la concentración de urea incrementa, además, si la concentración de urea es elevada provoca la muerte de la biomasa existente en el medio de cultivo. Por otro lado, el efecto del KNO_3 fue recíproco con el decrecimiento gradual de la biomasa frente al factor urea.

Gráfica de superficie de respuesta para biomasa

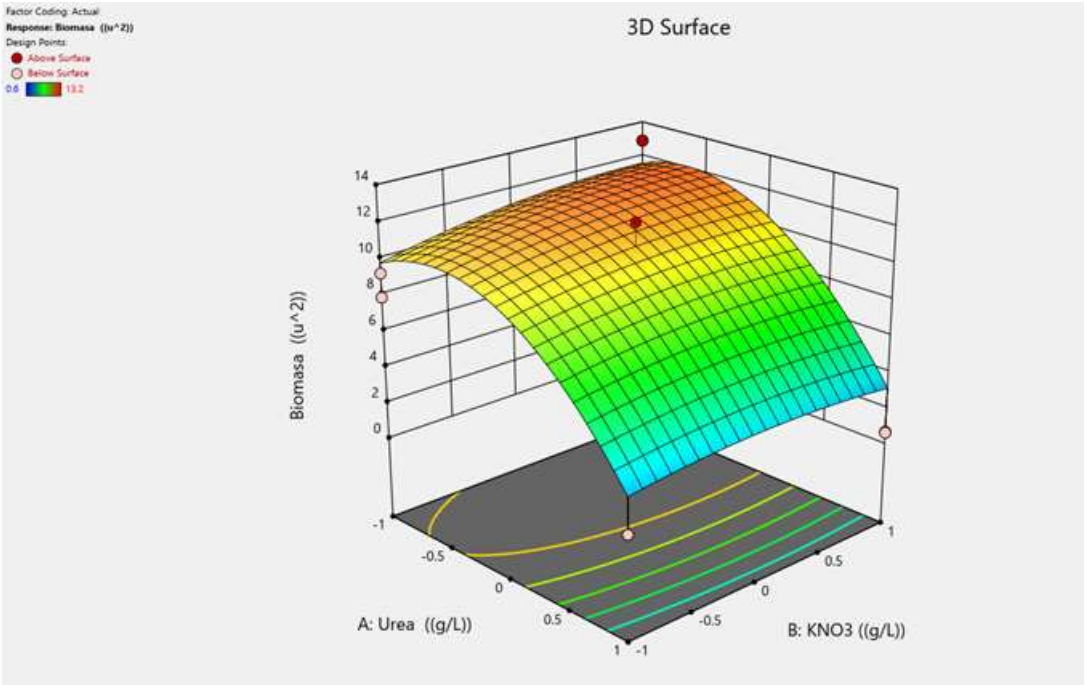

Figura 16. Gráfica de superficie de respuesta de biomasa frente a los factores urea y KNO_3

Elaborado por: (La autora, 2023).

Gráfica de curvas de contorno para biomasa

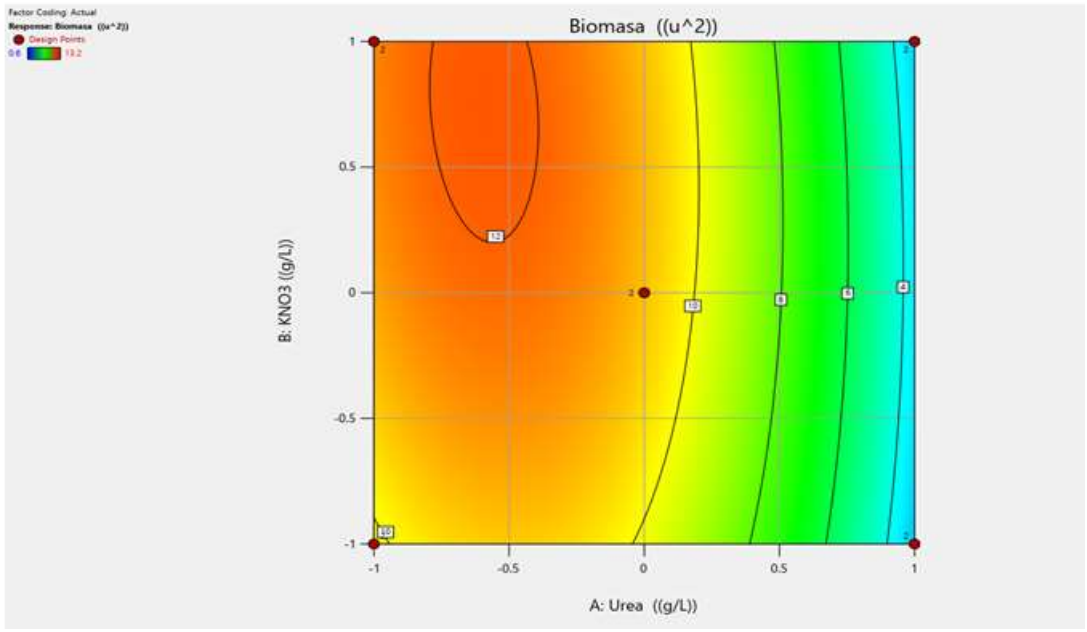

Figura 17. Gráfica de curvas de contorno para biomasa frente a los factores urea y KNO_3.

Elaborado por: (La autora, 2023).

5.5 Análisis de superficie de respuesta de ficocianina

En el presente estudio, la ficocianina tuvo un comportamiento directamente proporcional al crecimiento de biomasa. De acuerdo con Castro et al. (2015), la productividad de biomasa tiene correlación directa con la concentración de ficocianina, debido al almacenamiento de nitrógeno en forma de compuestos orgánicos, como las proteínas (ficocianina). En la gráfica de Pareto estandarizada que se muestra en la Figura 18.B, se visualizaron los efectos principales de las variables y sus interacciones en cuanto a la producción de ficocianina. Los resultados se analizaron con un valor de significancia estadística p = 0.05 y con un nivel de confianza de 95%. Se demostró que, como se vio en los resultados de biomasa, los efectos de la urea siguen la misma tendencia sobre la producción de ficocianina, afectando de manera negativa. Las barras que representan al factor urea (A) y su interacción cuadrática (AA) se extendieron más allá de la línea azul que representa el valor de p = 0.05; por lo que se concluye que el factor urea tuvo significancia estadística representativa. Los efectos negativos del factor urea se determinaron de la siguiente manera: urea (A) > urea * urea (AA). Además, en la gráfica se puede observar que el factor KNO_3 tiene efectos positivos en la producción de ficocianina, sin embargo, las barras denotan que su influencia no es significativa estadísticamente.

Gráfica de efectos principales y gráfica de Pareto para ficocianina

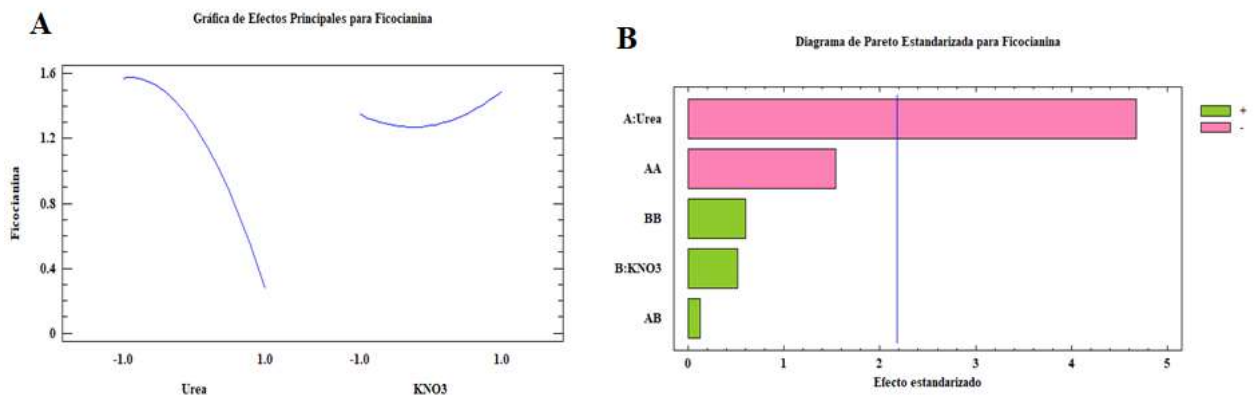

Figura 18. Gráfica de efectos principales y de Pareto para ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Por otro lado, en la gráfica de efectos principales, mostrada en la Figura 18.A, se observa que, al incrementar la concentración de urea, la producción de ficocianina descendió, hasta llegar al punto de producción nula. Por otra parte, el efecto del KNO_3 es positivo en la producción de ficocianina, pero cabe señalar que este resultado no tuvo significancia estadística.

5.5.1 Superficie de respuesta y curvas de contorno para ficocianina

En la Figura 19 y Figura 20 se presentaron la gráfica de superficie de respuesta y las curvas de contorno para la producción de ficocianina, en donde se denotan los efectos de la concentración de urea y KNO_3. Las gráficas revelan que, a medida que la concentración de urea incrementó, la producción de ficocianina fue afectada negativamente. Lo que significa que, las bajas concentraciones de urea provocaron un efecto satisfactorio en el incremento de la producción de ficocianina. En cuanto al factor KNO_3, las gráficas reflejaron que su influencia en la producción de ficocianina no posee significancia estadística, ya que las curvas presentan la misma tendencia en cuanto a las distintas concentraciones de urea.

Gráfica de superficie de respuesta ficocianina

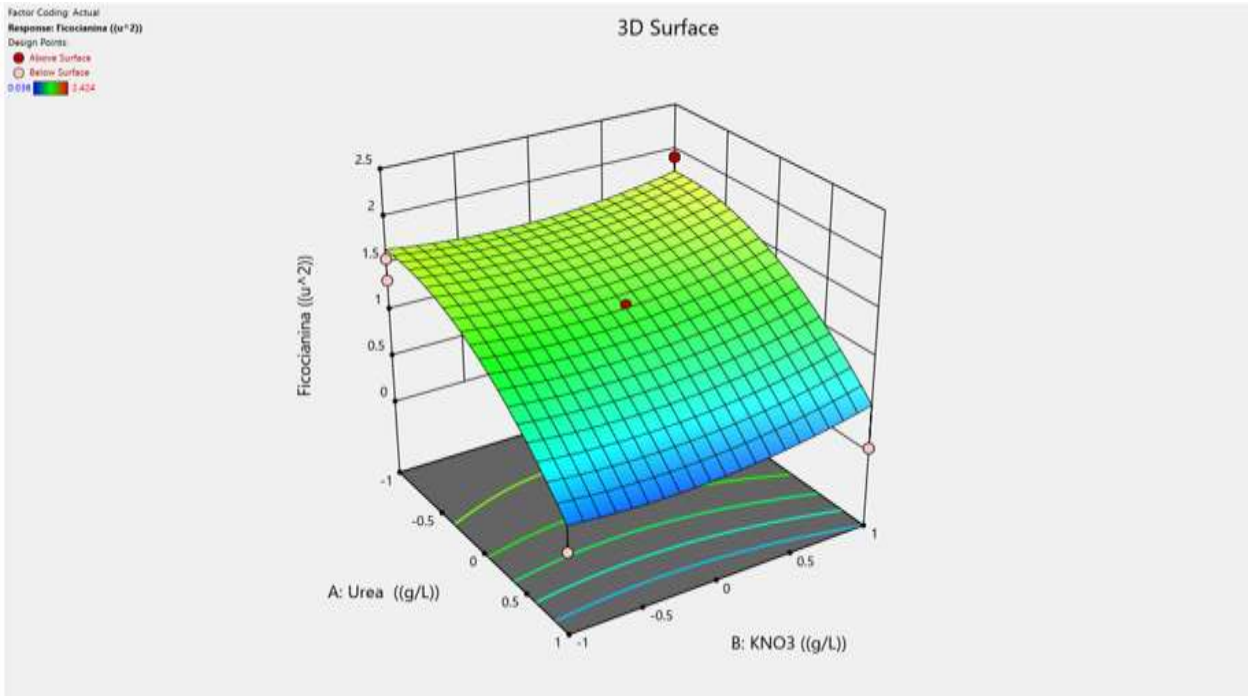

Figura 19. Gráfica de superficie de respuesta para ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Gráfica de curvas de contorno para ficocianina

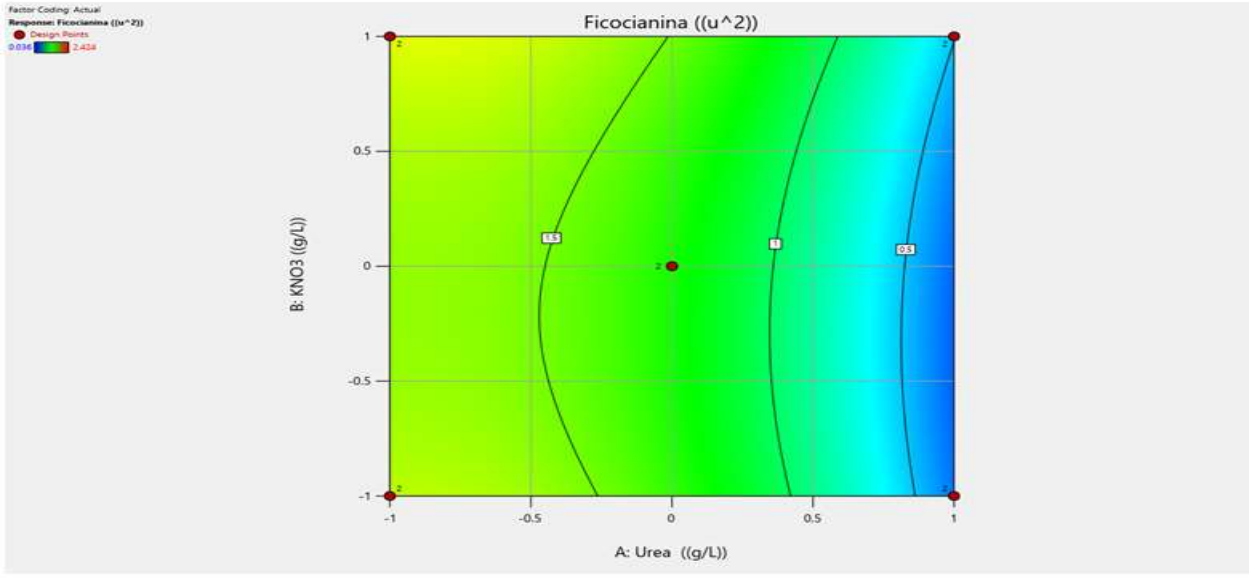

Figura 20. Gráfica de curvas de contorno para ficocianina.

Elaborado por: (La autora, 2023).

Teniendo en cuenta los hallazgos descritos, el estudio consideró que las concentraciones más altas de urea son perjudiciales en el crecimiento de *Arthrospira platensis* y consecuentemente en la producción de ficocianina.

5.6 Optimización y validación de modelos

Uno de los objetivos principales del estudio presentado fue determinar los parámetros de concentración de urea y KNO_3 óptimos para maximizar el crecimiento de biomasa de *Arthrospira platensis* y producción de ficocianina. En esta evaluación se empleó la función de deseabilidad, de esta forma se definió el compromiso entre respuestas. Para realizar el proceso de optimización se utilizó el Software estadístico Minitab, que definió los valores de deseabilidad entre 0 a 1, en donde 0 reflejan las respuestas mínimas y 1 las respuestas máximas de cada modelo (Rudnykh et al., 2018). Para encontrar las condiciones óptimas se estableció los parámetros de deseabilidad de las respuestas. A partir de las mediciones de biomasa y ficocianina obtenidas de los 18 experimentos durante el periodo experimental (24 días), se obtuvo los siguientes resultados del proceso de optimización: En la Figura 21 se mostró un el valor de deseabilidad general de 0.8408, siendo una

puntuación alta en el proceso de maximización de respuestas. Las condiciones óptimas de concentración para urea y biomasa fueron de -0.7163 y 1.4142 en unidades codificadas; estas condiciones óptimas predicen los siguientes resultados para las variables de respuesta: ficocianina = 1.9193 u^2 y biomasa = 11.8938 u^2, los resultados generados en la optimización del proceso se encuentran detallados en la Tabla 13. Además, el valor real óptimo de KNO3, para la maximización de las variables de respuesta fue de 4.5 g/L, correspondiente al valor codificado α = 1.4142; el valor real óptimo de urea fue de 0,101 g/L, correspondiente al valor codificado de -0.7163.

Tabla 13. Resultados generados de la optimización de factores.

Factores: valores codificados		**Valores óptimos reales**		**Optimización de resultados**		**Deseabilidad General**
Urea	KNO_3	Urea (g/L)	KNO_3 (g/L)	Ficocianina (u^2)	Biomasa (u^2)	0.8408
-0.7163	1.414	0,101	4.5	1.9193	11.8938	

Elaborado por: (La autora, 2023).

Optimización: valores óptimos de los factores y coeficiente de deseabilidad

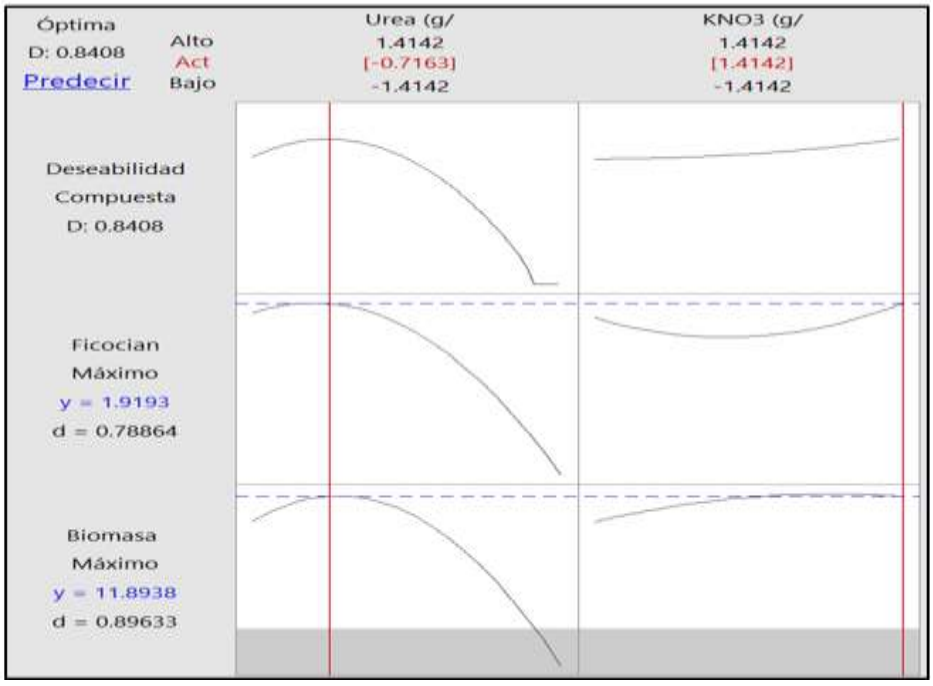

Figura 21. Resultados de la optimización de los factores y determinación del coeficiente de deseabilidad.

Elaborado por: (La autora, 2023).

En la Tabla 14 se realizó la comparación de los resultados experimentales obtenidos del tratamiento 1, ya que posee la concentración de KNO_3 proporcionada por el modelo de optimización; y la concentración de urea es cercana a la propuesta por el programa estadístico en el modelo optimizado. Los datos analizados corresponden a las medias de los resultados obtenidos de las réplicas. Los resultados experimentales obtenidos a partir del tratamiento 1 tienen correlación con los valores predichos tanto para el crecimiento de biomasa como para la producción de ficocianina.

Tabla 14. Comparación del mejor tratamiento frente a los resultados optimizados

Tratamiento	**Resultado experimental**	**Valor previsto**	**Valor experimental**	**Exactitud**
1	Biomasa (u^2)	11.8938	12.79	92.43%
	Ficocianina (u^2)	1.9193	2.142	87.85%

Elaborado por: (La autora, 2023).

5.7 Correlación entre el consumo de nitratos frente a la producción de biomasa y ficocianina

La calidad de *A. platensis* depende de los nutrientes presentes en el medio de cultivo, en donde el nitrógeno es necesario para su crecimiento, ya que genera la producción de aminoácidos que son componentes básicos de las proteínas (AlFadhly et al., 2022). Generalmente se utiliza KNO_3 como fuente de nitrógeno en la elaboración de los medios de cultivo. En el presente estudio se analizó la tasa de consumo de nitratos en cada uno de los tratamientos realizados. También se examinó la correlación entre las distintas concentraciones de KNO_3 y los nitratos (NO_3 –N) obtenidos en las 18 corridas experimentales.

Para estudiar la correlación entre las concentraciones de KNO_3 utilizadas en el diseño y la concentración de nitratos (NO_3 –N), se realizó un análisis de varianza (ANOVA). El objetivo de este análisis es comparar los tratamientos con respecto a sus medias poblacionales; además, realizar una comparación con respecto a sus varianzas, de esta forma se establecieron las siguientes hipótesis:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_8 = \mu$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

En el análisis se designó un 95% de nivel de confianza, siendo el valor de significancia **α** de 0.05; este valor nos permite identificar si la diferencia entre medias es estadísticamente significativa. En la Tabla 15 se muestra el análisis de varianza realizado; se observa que el vapor-p = 0.000 es menor que el valor de **α,** por lo tanto, se rechaza la H_0 y se acepta que al menos un par de las 18 corridas experimentales tiene un valor de medias diferentes, por lo que se concluye que la concentración de KNO_3 influye en la medición de concentración de nitratos en cada uno de los tratamientos estudiados.

Adicionalmente, para corroborar que el rechazo de la hipótesis nula, se estudió el valor $F_{(0.05, 4, 13)}$ de la tabla de distribución F para un 95% de nivel de confianza, en donde $F = 47.28 > F_{(0.05, 4, 13)} = 3.18$. De esta forma se concluye que si existe efecto en los distintos niveles de concentración de KNO3 en cuanto a la concentración de nitratos (NO_3^-–N) en las 18 corridas experimentales.

Tabla 15. Análisis de varianza (ANOVA) del factor KNO_3 y la concentración de NO_3^-

Fuente	**GL**	**SC Sec**	**Contribución**	**α**	**Valor F**	**Valor p**
KNO_3 (g/L)	4	9.1831	93.57%	0.05	47.28	0.000
Error	13	0.6312	6.43%			
Total	17	9.8143	100%			

Elaborado por: (La autora).

Arthrospira platensis no posee la capacidad de fijar N_2; para la utilización de las fuentes de nitrógeno, como los iones NO_2 y NH^+, esta cianobacteria requiere de transportadores de membrana específicos como el NRTs (Nitrate Transporters). Cuando el nitrato ha ingresado a las células, éste se reduce a nitrito por la enzima nitrato reductasa (Nar), y posteriormente a amoníaco gracias a la enzima nitrito reductasa (Nir). Finalmente, el amoniaco se incorpora a los esqueletos de carbono que constituyen a la microalga. Sin embargo, la presencia de amonio inhibe reversiblemente la asimilación de fuentes alternativas de N, como los nitratos, esto ocurre a causa de la inactivación

de los transportadores específicos para nitratos (Deschoenmaeker et al., 2017). Por lo anteriormente mencionado, en la Figura 22 se observó el consumo de nitratos en cada uno de los tratamientos, en donde se evidencia un comportamiento fluctuante entre incrementos y decrementos sucesivos en el consumo de dicho componente, esto puede atribuirse por la presencia de urea en la elaboración de los medios de cultivo. En el Anexo 5 se encuentran los resultados de consumo de nitratos para cada una de las mediciones realizadas.

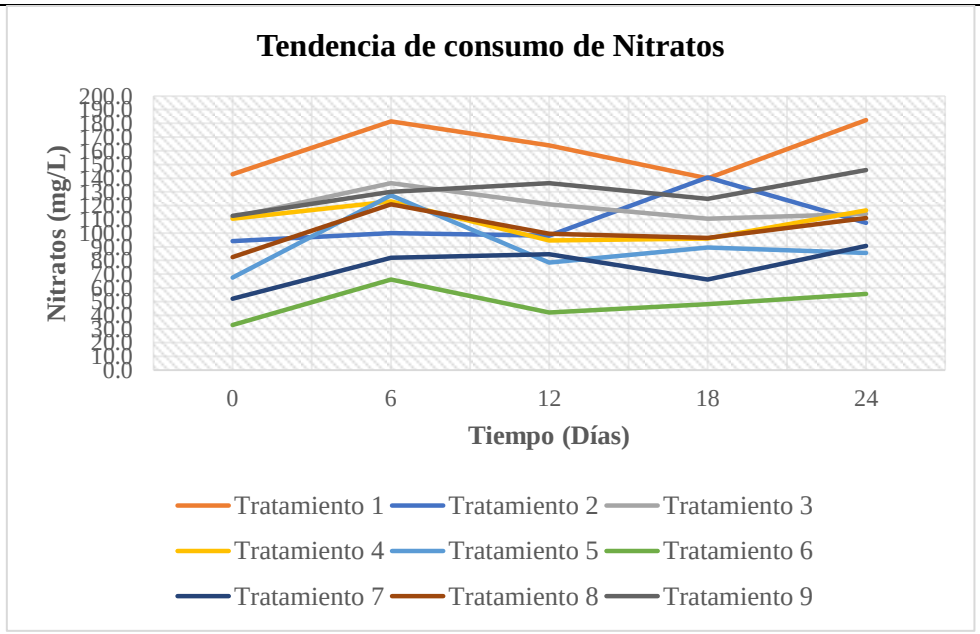

Figura 22. Líneas de tendencia de consumo de nitratos (NO_3^-).

Elaborado por: (La autora, 2023).

5.8 Correlación entre el consumo de amoníaco frente a la producción de biomasa y ficocianina

Sukumaran et al. (2018) mencionan los beneficios de emplear nitrógeno comercial alternativo en la elaboración de medios de cultivo para el crecimiento de *A. platensis*, por ejemplo el empleo de urea, esto se debe a su bajo costo en el mercado. Sin embargo, las elevadas concentraciones de urea ejercen un efecto tóxico y por consiguiente podrían provocar el colapso del cultivo de microalgas. La concentración adecuada de urea aumentó el crecimiento de *A. platensis* en lo que respecta a densidad óptica, peso seco de biomasa, contenido de proteínas, como las ficobiliproteínas. En la Figura 23 se reflejan las líneas de tendencia de consumo de amoniaco (NH_3), se observa que

en los tratamientos en donde la concentración inicial de urea es elevada (tratamientos 4, 5, 9), los niveles de amoniaco son proporcionales. Estos niveles elevados de urea provocaron condiciones de estrés y toxicidad al ambiente microalgal, por lo que la biomasa inicialmente existente murió. Además, se observa que en el día 6, la concentración de amoniaco aumenta en todos los tratamientos, y las mediciones siguientes, este valor desciende, esto puede atribuirse al consumo de amoniaco es mayormente asimilable en concentraciones bajas de urea. El mayor crecimiento de biomasa y producción de ficocianina se observó en el tratamiento 1, que a pesar de tener un incremento en la concentración de amoniaco en el día 6, el crecimiento de biomasa fue constante durante todo el período experimental. A partir del día 6, se observa el consumo de amoníaco, es decir la disminución de la concentración de este componente en el medio de cultivo.

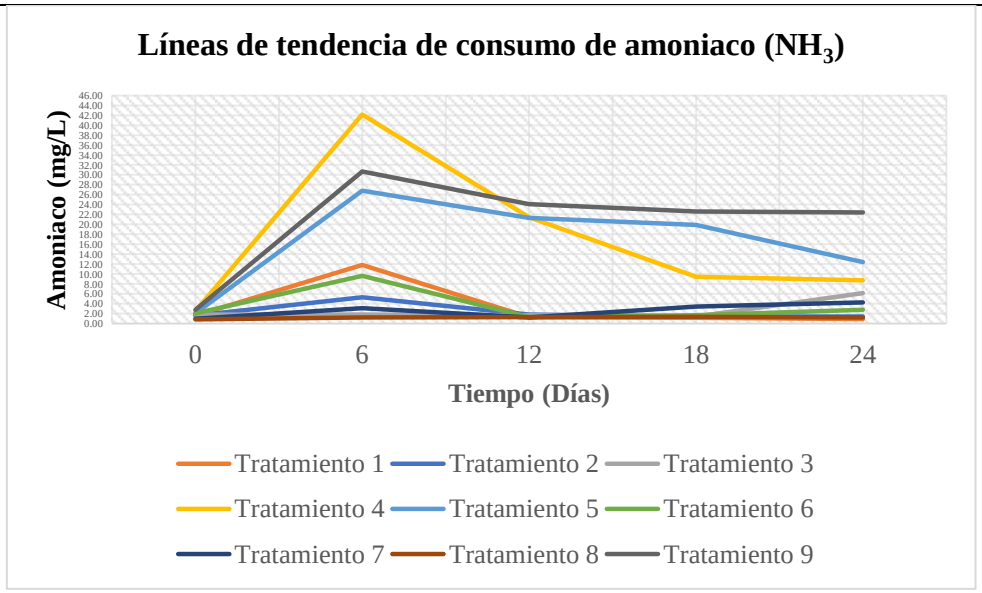

Figura 23. Líneas de tendencia de consumo de amoniaco (NH_3).

Elaborado por: (La autora, 2023).

Mulokozi et al. (2019) afirman que la espirulina no puede crecer por encima de la concentración de urea de 3mM, sino que se observó un fuerte olor a amoníaco. En condiciones alcalinas la urea se descompone en amoníaco que, en grandes concentraciones, actúa como una toxina que dificulta la fotosíntesis y el crecimiento de esta especie; esta información se corroboró con los resultados obtenidos en los tratamientos 4, 5, y 9, en donde no se observó crecimiento de biomasa. Los

resultados del consumo de amoniaco de las cinco mediciones realizadas durante el periodo experimental se observan en el Anexo 6.

A continuación, se estudió la correlación entre la concentración de urea empleada en el diseño de investigación y la concentración de amoniaco (NH_3), para ello se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con el fin de verificar dichas concentraciones con respecto a sus medias poblacionales, y además, realizar una comparación de sus varianzas. En este estudio se realizaron las siguientes hipótesis:

$$H_0: \ \mu_1 = \mu_2 = \ldots = \mu_8 = \mu$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \text{ para algún } i \neq j$$

En el análisis se empleó un valor de significancia $\alpha = 0.05$, con un 95% de nivel de confianza, este valor permite identificar si la diferencia entre medias es estadísticamente significativa. Los resultados del análisis de varianza están detallados en la Tabla 16; se observa que el vapor $p = 0.000$ es menor que el valor de significancia **α,** por consiguiente, se rechaza la H_0 y se acepta la H_A, es decir, que al menos un par de las 18 corridas experimentales presenta diferencia en el valor de sus medias. Se concluyó que la concentración de urea afecta de forma proporcional en la concentración de NH_3 en cada uno de los tratamientos estudiados.

Tabla 16. Análisis de varianza (ANOVA) del factor urea y la concentración de amoniaco (NH_3)

Fuente	**GL**	**SC Sec**	**Contribución**	**α**	**Valor F**	**Valor p**
Urea(g/L)	4	0.7204	94.07%	0.05	51.51	0.000
Error	13	0.0454	5.93%			
Total	17	0.7658	100%			

Elaborado por: (La autora, 2023).

También se estudió el valor $F_{(0.05,\ 4,\ 13)}$ de la tabla de distribución F para un 95% de nivel de confianza, en donde $F = 51.51 > F_{(0.05,\ 4,\ 13)} = 3.18$. De esta forma se determinó la correlación entre

los distintos niveles de concentración urea en lo que respecta a la concentración de amoniaco (NH_3) en las 18 corridas experimentales.

5.9 Tendencia de consumo de sulfatos y fosfatos frente al crecimiento de biomasa y producción de ficocianina

De acuerdo con Magwell et al. (2021), la nutrición con sulfatos tiene una gran influencia en el crecimiento de *A. platensis*. Además, el número de verticilos y filamentos es causado por la concentración de sales de sulfato. Por otro lado, en medios de cultivo donde la concentración es elevada (> 1.28 g/L), el crecimiento de biomasa se ve afectado, debido a la reducción de la actividad fotosintética, que puede atribuirse a la toxicidad que genera esta sal. Sin embargo, en este estudio se menciona que, las bajas concentraciones de sulfato, también afectan negativamente a la biomasa microalgal, causando una reducción en la multiplicación celular, al mismo tiempo que influye en el metabolismo del carbono en la actividad fotosintética.

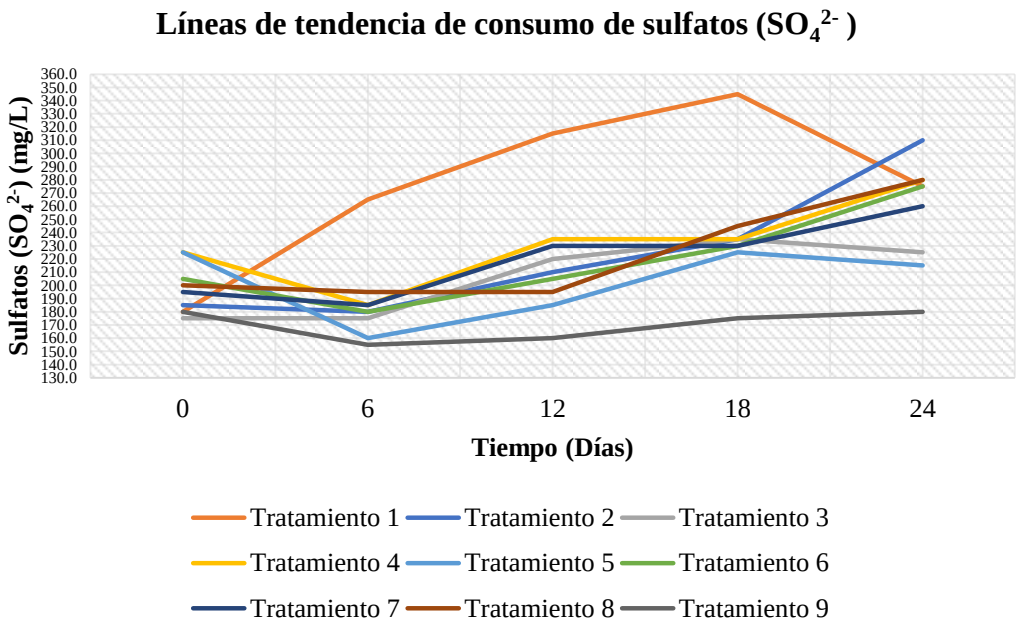

Figura 24. Líneas de tendencia de consumo de sulfatos (SO_4^{2-})

Elaborado por: (La autora, 2023).

En la Figura 24 y Figura 25 se presentan las líneas de tendencia de consumo de sulfatos y fosfatos respectivamente. Además, en el Anexo 7 y Anexo 8 se reflejan los resultados del consumo de fosfatos y sulfatos en el periodo experimental establecido.

En cuanto al consumo de sulfatos se observa que existen fluctuaciones de producción y consumo de este compuesto. Estas fluctuaciones pueden atribuirse a las elevadas concentraciones de sulfatos por lo que no podrían ser fácilmente asimilables por el microorganismo y la presencia de biomasa muerta generó la descomposición de la microalga, generando residuos de sulfatos al medio de cultivo.

En lo referente al consumo de fosfatos, se observó que tiene una tendencia oscilatoria en los tratamientos viables, con incrementos y decrementos sucesivos. En el estudio realizado por Z. Li et al. (2022), se señala que la tasa de crecimiento de biomasa de *A. platensis* alcanzó el nivel más alto cuando se usó una concentración de fosfato de 0.50 g/L. Además, el fosfato en concentraciones de 0.00 y 10 g/L provoca tasas bajas de crecimiento y producción de biomasa. También, se mencionó que el exceso de fosfato no promueve el crecimiento microalgal, provocando la sobreacumulación de poli fosfato en las células causando la destrucción de permeabilidad de la membrana y la función enzimática se encuentra perjudicada. En este estudio se informa que la producción de exopolisacáridos por parte de *A. platensis* ocasiona el aumento de la concentración de fosfato en el medio de cultivo. En la Figura 25 se evidencia este fenómeno en donde existe consumo de fosfatos y producción de estos por parte de las microalgas.

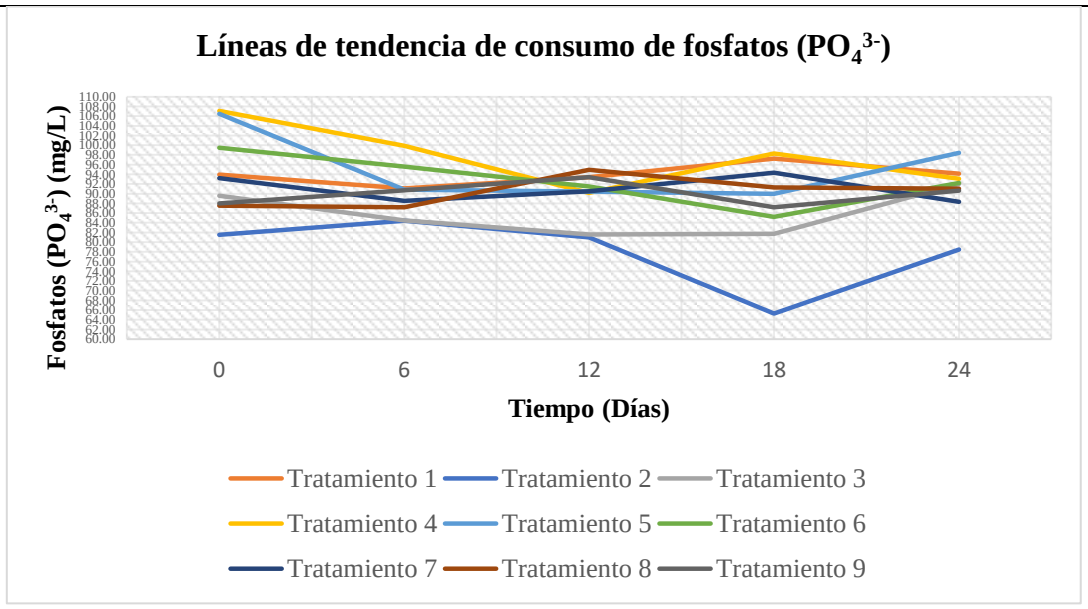

Figura 25. Líneas de tendencia de consumo de fosfatos (PO_4^{3-})

Elaborado por: (La autora, 2023).

6 Conclusiones y recomendaciones

El presente trabajo experimental se realizó para encontrar los valores óptimos de las concentraciones de las fuentes de nitrógeno (urea y KNO_3) para maximizar el crecimiento de la biomasa de *Arthrospira platensis* y la producción de ficocianina. Los resultados provenientes de la metodología de superficie de respuesta fueron satisfactorios para optimizar las variables independientes y analizar sus efectos sobre las variables de respuestas (biomasa y ficocianina). Los modelos polinómicos cuadráticos demostraron un nivel adecuado de precisión de predicción. La condición óptima se predijo utilizando la función de deseabilidad, en donde se obtuvo un valor de 0.84, evidenciando un puntaje adecuado en el proceso de optimización. El objetivo principal de este estudio fue maximizar el crecimiento de biomasa de *A. platensis* y la producción de ficocianina. Se estableció que las concentraciones optimizadas utilizando MSR de -0.716 y 1.414, en unidades codificadas, para urea y KNO_3, respectivamente. Los valores óptimos reales para urea y KNO_3 son 0.101 g/L y 4.5 g/L respectivamente.

Además, es importante resaltar que las concentraciones de urea tuvieron relación directa con las concentraciones de amoniaco. Se observó que los tratamientos que fueron elaborados con mayores concentraciones de urea, provocaron la muerte de la biomasa microalgal debido a la toxicidad del medio de cultivo. Sin embargo, en los tratamientos donde los niveles de urea eran bajos, se incrementó la producción de biomasa y ficocianina, esto suceso se atribuye a la facilidad que tiene *A. platensis* para asimilar esta fuente de nitrógeno, sin gasto energético. Durante el período de estudio no existió significancia en el consumo de nitratos, esto se debe a que las concentraciones elevadas de amoniaco causadas por la presencia de urea en los medios de cultivo, inhiben a los transportadores específicos de nitratos (NRTs) en el interior de la cianobacteria. Por otro lado, existió fluctuaciones de consumo fosfatos y sulfatos, se puede atribuir a la producción de exopolisacáridos por parte de *A. platensis,* además estos incrementos y decrementos sucesivos pueden deberse a los residuos de fósforo y azufre de la biomasa muerta.

Al realizar los análisis de reproducibilidad se observó que el proceso de extracción y cuantificación de ficocianina es reproducible con un valor de 0.07%. Si se obtiene un valor de reproducibilidad menor al 10 %, significa que el proceso es adecuado.

Finalmente, se recomienda realizar más estudios para comprender el comportamiento de los factores estudiados, particularmente del factor urea. Además, en futuros estudios se deben evaluar niveles de urea más bajos para evitar la toxicidad del medio y lograr mejores respuestas en lo que respecta al crecimiento de biomasa y producción de ficocianina.

7 Bibliografía

AlFadhly, N. K. Z., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., & Cacciola, F. (2022). Tendencies Affecting the Growth and Cultivation of Genus Spirulina: An Investigative Review on Current Trends. *Plants*, *11*(22), 3063. https://doi.org/10.3390/plants11223063

AlFadhly, N. K. Z., Alhelfi, N., Altemimi, A. B., Verma, D. K., Cacciola, F., & Narayanankutty, A. (2022). Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of Spirulina and Their Health Benefits: A Review. *Molecules*, *27*(17), 5584. https://doi.org/10.3390/molecules27175584

Alkiayat, M. (2021). A Practical Guide to Creating a Pareto Chart as a Quality Improvement Tool. *Global Journal on Quality and Safety in Healthcare*, *4*(2), 83–84. https://doi.org/10.36401/JQSH-21-X1

Andrade, L., De Andrade, C. J., Dias, M., Nascimento, C., & Mendes, M. (2018). Chlorella and Spirulina Microalgae as Sources of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements; an Overview. *MOJ Food Processing & Technology*, *6*, 00144.

Antony, J. (2014). 4—A Systematic Methodology for Design of Experiments. En J. Antony (Ed.), *Design of Experiments for Engineers and Scientists (Second Edition)* (pp. 33–50). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099417-8.00004-3

Aoki, J., Sasaki, D., & Asayama, M. (2021). Development of a method for phycocyanin recovery from filamentous cyanobacteria and evaluation of its stability and antioxidant capacity. *BMC Biotechnology*, *21*, 40. https://doi.org/10.1186/s12896-021-00692-9

Barrera García, A., Cambra Díaz, A., & González González, J. A. (2017). IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA SEIS SIGMA EN LA GESTIÓN DE LAS MEDICIONES. *Revista Universidad y Sociedad*, *9*(2), 8–17.

Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). COMPLEMENTARY CHROMATIC ADAPTATION IN A FILAMENTOUS BLUE-GREEN ALGA. *Journal of Cell Biology*, *58*(2), 419–435. https://doi.org/10.1083/jcb.58.2.419

Blas-Valdivia, V., Moran-Dorantes, D. N., Rojas-Franco, P., Franco-Colin, M., Mirhosseini, N., Davarnejad, R., Halajisani, A., Tavakoli, O., & Cano-Europa, E. (2022). C-Phycocyanin prevents acute myocardial infarction-induced oxidative stress, inflammation and cardiac damage. *Pharmaceutical Biology*, *60*(1), 755–763. https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2055089

Bleakley, S., & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods (Basel, Switzerland)*, *6*(5), 33. https://doi.org/10.3390/foods6050033

Boylan, G. L., & Cho, B. R. (2012). The Normal Probability Plot as a Tool for Understanding Data: A Shape Analysis from the Perspective of Skewness, Kurtosis, and Variability. *Quality and Reliability Engineering International*, *28*(3), 249–264. https://doi.org/10.1002/qre.1241

Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: The serum-free media interactive online database. *ALTEX*, *27*(1), 53–62. https://doi.org/10.14573/altex.2010.1.53

Castro, G. F. P. da S. de, Rizzo, R. F., Passos, T. S., Santos, B. N. C. dos, Dias, D. da S., Domingues, J. R., & Araújo, K. G. de L. (2015). Biomass production by *Arthrospira platensis* under different culture conditions. *Food Science and Technology*, *35*, 18–24. https://doi.org/10.1590/1678-457X.6421

Çelekli, A., Yavuzatmaca, M., & Bozkurt, H. (2009). Modeling of biomass production by Spirulina platensis as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresource Technology*, *100*(14), 3625–3629. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.055

Choi, W. Y., & Lee, H. Y. (2018). Effect of Ultrasonic Extraction on Production and Structural Changes of C-Phycocyanin from Marine Spirulina maxima. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(1), 220. https://doi.org/10.3390/ijms19010220

Colla, L. M., Oliveira Reinehr, C., Reichert, C., & Costa, J. A. V. (2007). Production of biomass and nutraceutical compounds by Spirulina platensis under different temperature and nitrogen

regimes. *Bioresource Technology*, *98*(7), 1489–1493. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.09.030

Converti, A., Scapazzoni, S., Lodi, A., & Carvalho, J. C. M. (2006). Ammonium and urea removal by Spirulina platensis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *33*(1), 8–16. https://doi.org/10.1007/s10295-005-0025-8

Cosenza, Z., Astudillo, R., Frazier, P. I., Baar, K., & Block, D. E. (2022). Multi-information source Bayesian optimization of culture media for cellular agriculture. *Biotechnology and Bioengineering*, *119*(9), 2447–2458. https://doi.org/10.1002/bit.28132

Dahiru, T. (2008). P – VALUE, A TRUE TEST OF STATISTICAL SIGNIFICANCE? A CAUTIONARY NOTE. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, *6*(1), 21–26.

Deschoenmaeker, F., Bayon-Vicente, G., Sachdeva, N., Depraetere, O., Cabrera Pino, J. C., Leroy, B., Muylaert, K., & Wattiez, R. (2017). Impact of different nitrogen sources on the growth of Arthrospira sp. PCC 8005 under batch and continuous cultivation – A biochemical, transcriptomic and proteomic profile. *Bioresource Technology*, *237*, 78–88. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.145

Domínguez, J. D., & Tostado, E. C. (2016). *Diseño de experimentos: Estrategias y análisis en ciencias e ingenierías*. Alpha Editorial.

Dreckmann, K., Sentíes, A., & Núñez, M. (2013). Manual de prácticas de laboratorio Biología de Algas. *Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa*, 13–15.

Elain, A., Nkounkou, C., Le Fellic, M., & Donnart, K. (2020). Green extraction of polysaccharides from Arthrospira platensis using high pressure homogenization. *Journal of Applied Phycology*, *32*(3), 1719–1727. https://doi.org/10.1007/s10811-020-02127-y

El-Shouny, W., Sharaf, M., Abomohra, A., & Abo-Eleneen, M. (2015). Production enhancement of some valuable compounds of Arthrospira platensis. *J. Basic Environ. Sci*, *2*, 74–83.

Fernández Honores, A. M., Alvítez Izquierdo, E., & Rodríguez Rodríguez, E. F. (2019). Taxonomía e importancia de "spirulina" Arthrospira jenneri (Cyanophyceae: Oscillatoriaceae). *Arnaldoa*, *26*(3), 1091–1104. https://doi.org/10.22497/arnaldoa.263.26316

Gómez, C., Guzmán-Carrasco, A., Lafarga, T., & Acién-Fernández, F. G. (2021). Optimization of a New Culture Medium for the Large-Scale Production of Protein-Rich Arthrospira Platensis (oscillatoriales, Cyanophyceae). *Journal of Phycology*, *57*(2), 636–644. https://doi.org/10.1111/jpy.13111

Gutiérrez Pulido, H. (2012a). *Análisis y diseño de experimentos*.

Gutiérrez Pulido, H. (2012b). *Análisis y diseño de experimentos*.

Hach DR. (2023). *Colorímetro DR900 | Hach Mexico—Descargas| Hach*. https://latam.hach.com/colorimetros/colorimetro-dr900/family-downloads?productCategoryId=54617006119

Hao, S., Li, S., Wang, J., Zhao, L., Yan, Y., Wu, T., Zhang, J., & Wang, C. (2019). C-Phycocyanin Suppresses the In Vitro Proliferation and Migration of Non-Small-Cell Lung Cancer Cells through Reduction of RIPK1/NF-κB Activity. *Marine Drugs*, *17*(6), 362. https://doi.org/10.3390/md17060362

Haoujar, I., Haoujar, M., B. Altemimi, A., Essafi, A., & Cacciola, F. (2022). Nutritional, sustainable source of aqua feed and food from microalgae: A mini review. *International Aquatic Research*, *14*(3), 157–167. https://doi.org/10.22034/iar.2022.1958713.1278

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, *49*(2), 157–173.

Jin, F. L., & Lu, P. J. (2015). Production of aquatic feed grade algal powder from turtle breeding wastewater using a locally isolated Spirulina sp. JXSC-S1. *African Journal of Microbiology Research*, *9*(51), 2404–2409.

Jung, C. H. G., Braune, S., Waldeck, P., Küpper, J.-H., Petrick, I., & Jung, F. (2021). Morphology and Growth of Arthrospira platensis during Cultivation in a Flat-Type Bioreactor. *Life*, *11*(6), 536. https://doi.org/10.3390/life11060536

Kasina, M. M., Joseph, K., & John, M. (2020). Application of Central Composite Design to Optimize Spawns Propagation. *Open Journal of Optimization*, *9*(3), Article 3. https://doi.org/10.4236/ojop.2020.93005

Khazi, M. I., Demirel, Z., & Dalay, M. C. (2018). Enhancement of biomass and phycocyanin content of Spirulina platensis. *Frontiers in Bioscience-Elite*, *10*(2), Article 2. https://doi.org/10.2741/E822

Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent Developments in Production and Biotechnological Applications of C-Phycocyanin. *BioMed Research International*, *2013*, 742859. https://doi.org/10.1155/2013/742859

Kuehl, R. (2000). Principios estadísticos para el diseño y análisis de investigaciones. *Thomson Learning. 2da ed. México y América Central, Mexico*.

Kumar, D., Dhar, D. W., Pabbi, S., Kumar, N., & Walia, S. (2014). Extraction and purification of C-phycocyanin from Spirulina platensis (CCC540). *Indian Journal of Plant Physiology*, *19*(2), 184–188. https://doi.org/10.1007/s40502-014-0094-7

Kumari, A., Pathak, A. K., & Guria, C. (2015). Cost-Effective Cultivation of Spirulina platensis Using NPK Fertilizer. *Agricultural Research*, *4*(3), 261–271. https://doi.org/10.1007/s40003-015-0168-4

Li, Y., Li, X., Liang, Z.-P., Chang, X.-Y., Li, F.-T., Wang, X.-Q., & Lian, X.-J. (2022). Progress of Microencapsulated Phycocyanin in Food and Pharma Industries: A Review. *Molecules*, *27*(18), 5854. https://doi.org/10.3390/molecules27185854

Li, Z., Liu, Y., Zhou, T., Cao, L., Cai, Y., Wang, Y., Cui, X., Yan, H., Ruan, R., & Zhang, Q. (2022). Effects of Culture Conditions on the Performance of Arthrospira platensis and Its Production of Exopolysaccharides. *Foods*, *11*(14), 2020. https://doi.org/10.3390/foods11142020

Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Phycocyanin Inhibits Tumorigenic Potential of Pancreatic Cancer Cells: Role of Apoptosis and Autophagy. *Scientific Reports*, *6*, 34564. https://doi.org/10.1038/srep34564

Lisett, B., Guevara, M., Lemus, N., Freites, L., Romero, L., Lodeiros, C., & Arredondo-Vega, B. (2014). CRECIMIENTO Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DE Arthrospira platensis

(DIVISION CYANOPHYTA) CULTIVADA A DIFERENTES SALINIDADES Y FUENTES DE NITRÓGENO. *Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela*, *53*(1).

Liu, R.-Z., Li, W.-J., Zhang, J.-J., Liu, Z.-Y., Li, Y., Liu, C., & Qin, S. (2022). The Inhibitory Effect of Phycocyanin Peptide on Pulmonary Fibrosis In Vitro. *Marine Drugs*, *20*(11), 696. https://doi.org/10.3390/md20110696

Ljubic, A., Safafar, H., Holdt, S. L., & Jacobsen, C. (2018). Biomass composition of Arthrospira platensis during cultivation on industrial process water and harvesting. *Journal of Applied Phycology*, *30*(2), 943–954. https://doi.org/10.1007/s10811-017-1332-y

Magwell, P. F. R., Minyaka, E., Fotsop, O. W., Leng, M. S., & Lehman, L. G. (2021). Influence of Sulphate Nutrition on Growth Performance and Antioxidant Enzymes Activities of Spirulina platensis. *Journal of Agricultural Science*, *13*(10), Article 10. https://doi.org/10.5539/jas.v13n10p115

Markou, G., Chatzipavlidis, I., & Georgakakis, D. (2012). Effects of phosphorus concentration and light intensity on the biomass composition of Arthrospira (Spirulina) platensis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(8), 2661–2670. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1076-4

Martelli, F., Alinovi, M., Bernini, V., Gatti, M., & Bancalari, E. (2020). Arthrospira platensis as Natural Fermentation Booster for Milk and Soy Fermented Beverages. *Foods*, *9*(3), 350. https://doi.org/10.3390/foods9030350

Mashor, N., Yazam, M. S. M., Naqqiuddin, M. A., Omar, H., & Ismail, A. (2015). Cultivation of A. platensis based on the optimum concentrations of urea and triple super phosphate, ammonium sulfate and phosphoric acid, ammonium nitrate and triple super phosphate. *Seminar Ekologi Malasya*.

Masojídek, J., & Torzillo, G. (2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae☆. En *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8

Mateucci, R. (2018). *Efecto de diferentes fuentes de nitrógeno y de fósforo sobre la producción y la composición de la biomasa microalgal de Arthrospira (Spirulina) plantesis LMPA55*.

Maza, L. de los Á. R., Guevara, M. Á., Gómez, B. J., Arredondo-Vega, B., Cortez, R., & Licet, B. (2017). Producción de pigmentos procedentes de Arthrospira maxima cultivada en fotobiorreactores. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *19*(1), 108–114.

Melo, O., López, L., & Melo, S. (2020). *Diseño de experimentos: Métodos y aplicaciones*. Universidad Hispanoamericana.

Mohr, D. L., Wilson, W. J., & Freund, R. J. (2022). Chapter 2—Probability and Sampling Distributions. En D. L. Mohr, W. J. Wilson, & R. J. Freund (Eds.), *Statistical Methods (Fourth Edition)* (pp. 65–122). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823043-5.00002-3

Mulokozi, D. P. L., Mtolera, M. S. P., & Mmochi, A. J. (2019). Biomass production and growth performance of Momela Lake's spirulina (Arthrospira fusiformis) cultured under urea and N: P: K fertilizers as cheaper nitrogen sources. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *13*(2), Article 2. https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i2.23

Murillo, J. (2011). Métodos de investigación de enfoque experimental. *Recuperado el*, *2*.

Navarro Flores, J. R. (2012). *La técnica del área bajo la curva*. https://kerwa.ucr.ac.cr/handle/10669/585

Nosratimovafagh, A., Fereidouni, A. E., & Krujatz, F. (2022). Modeling and Optimizing the Effect of Light Color, Sodium Chloride and Glucose Concentration on Biomass Production and the Quality of Arthrospira platensis Using Response Surface Methodology (RSM). *Life*, *12*(3), 371. https://doi.org/10.3390/life12030371

Paisan, Y. P., & Moret, J. P. (2010). LA REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD EN EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS PROCESOS DE MEDICIÓN. *Chemical Technology*, *30*(2), Article 2. https://doi.org/10.1590/2224-6185.2010.2.%x

Planchón, G., & Fuentes, R. (1993). Esquema de guía de cultivo de Spirulina. *UNM San Marcos. Cochabamba, Bolivia*.

Pulido, H. G., De la Vara Salazar, R., González, P. G., Martínez, C. T., & Pérez, M. del C. T. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill New York, NY, USA:

Rey, G. G., & Anaya, C. E. F. (2015). Procedimiento para el análisis de repetibilidad y reproducibilidad en procesos de manufactura. *Revista Cubana de Ingeniería*, *6*(3), Article 3.

Rudnykh, S. I., Ríos, V. I. L., Rudnykh, S. I., & Ríos, V. I. L. (2018). ELECCIÓN DE LA FUNCIÓN DE DESEABILIDAD PARA DISEÑOS ÓPTIMOS BAJO RESTRICCIONES. *Revista EIA*, *15*(30), 13–24. https://doi.org/10.24050/reia.v15i30.903

Ruliaty, L., Amalia, I. R., Sari, R. I., & Aulia, R. (2022). Different Nitrogen Sources to Improve the Quality of Spirulina platensis Culture in Mass Scale. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *1118*(1), 012015. https://doi.org/10.1088/1755-1315/1118/1/012015

Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2009). 1.12—Response Surface Methodology. En S. D. Brown, R. Tauler, & B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* (pp. 345–390). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00083-1

Seo, Y. C., Choi, W. S., Park, J. H., Park, J. O., Jung, K.-H., & Lee, H. Y. (2013). Stable Isolation of Phycocyanin from Spirulina platensis Associated with High-Pressure Extraction Process. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(1), 1778–1787. https://doi.org/10.3390/ijms14011778

Shanthi, G., Premalatha, M., & Anantharaman, N. (2018). Effects of l-amino acids as organic nitrogen source on the growth rate, biochemical composition and polyphenol content of Spirulina platensis. *Algal Research*, *35*, 471–478. https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.09.014

Smalheiser, N. R. (2017). Chapter 11—ANOVA. En N. R. Smalheiser (Ed.), *How to Make your Experiments Robust and Reproducible* (pp. 149–155). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811306-6.00011-7

Sukumaran, P., Nulit, R., Halimoon, N., Simoh, S., Omar, H., & Ismail, A. (2018). Formulation of Cost-effective Medium Using Urea as a Nitrogen Source for Arthrospira platensis

Cultivation under Real Environment. *Annual Research & Review in Biology*, 1–12. https://doi.org/10.9734/ARRB/2018/38182

Wu, H., Li, T., Lv, J., Chen, Z., Wu, J., Wang, N., Wu, H., & Xiang, W. (2021). Growth and Biochemical Composition Characteristics of Arthrospira platensis Induced by Simultaneous Nitrogen Deficiency and Seawater-Supplemented Medium in an Outdoor Raceway Pond in Winter. *Foods*, *10*(12), 2974. https://doi.org/10.3390/foods10122974

Yang, K., Tu, J., & Chen, T. (2019). Homoscedasticity: An overlooked critical assumption for linear regression. *General Psychiatry*, *32*(5), e100148. https://doi.org/10.1136/gpsych-2019-100148

Zarrouk, C. (1966). Contribution a l'etude d'une Cyanophycee. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la croissance et la photosynthese de Spirulina mixima. *Thesis. University of Paris, France.*

Zhou, T., Reji, R., Kairon, R. S., & Chiam, K. H. (2023). A review of algorithmic approaches for cell culture media optimization. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1195294. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1195294

8 Anexos

Anexo 1. Tabla de resultados del DDC de las 18 corridas experimentales. Resultados totales de todo el período experimental.

		Unidades codificadas		Unidades originales		Resultados (área bajo la curva)					
Bloque	Experimento	Urea	KNO3	Urea (g/L)	KNO3 (g/L)	Biomasa (u^2)	Ficocianina (u^2)	Nitratos (u^2)	Sulfatos (u^2)	Fosfatos (u^2)	Amoniaco (u^2)
1	1	0.000	1.414	0.150	4.500	12.780	2.157	3.822	7.530	2.381	0.107
1	2	0.000	0.000	0.150	2.500	9.540	1.242	2.484	5.460	2.032	0.052
1	3	-1.000	1.000	0.080	3.500	6.660	0.783	2.988	5.190	2.046	0.060
1	4	1.414	0.000	0.310	2.500	0.900	0.036	2.439	5.340	2.332	0.571
1	5	1.000	-1.000	0.230	1.500	1.020	0.036	2.445	4.890	2.272	0.446
1	6	0.000	-1.414	0.150	0.500	8.760	1.371	1.044	5.130	2.203	0.079
1	7	-1.000	-1.000	0.080	1.500	9.240	1.563	1.599	5.610	2.153	0.055
1	8	-1.414	0.000	0.010	2.500	8.100	1.149	2.448	4.560	2.107	0.031
1	9	1.000	1.000	0.230	3.500	0.600	0.036	3.249	4.290	2.246	0.628
2	10	0.000	1.414	0.150	4.500	12.840	2.127	3.972	6.300	2.128	0.080
2	11	0.000	0.000	0.150	2.500	12.120	1.317	2.787	5.010	1.696	0.069
2	12	-1.000	1.000	0.080	3.500	12.900	1.920	2.781	4.770	2.017	0.047
2	13	1.414	0.000	0.310	2.500	0.900	0.036	2.685	5.550	2.330	0.373
2	14	1.000	-1.000	0.230	1.500	1.020	0.036	2.019	4.590	2.212	0.458
2	15	0.000	-1.414	0.150	0.500	12.540	1.959	1.359	5.130	2.215	0.101
2	16	-1.000	-1.000	0.080	1.500	7.920	1.335	2.046	4.860	2.216	0.070
2	17	-1.414	0.000	0.010	2.500	13.200	2.424	2.517	5.940	2.245	0.029
2	18	1.000	1.000	0.230	3.500	0.660	0.036	3.000	3.750	2.081	0.452

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 2. Tabla de resultados de biomasa (g/L): datos obtenidos a partir de la técnica de peso seco.

Día	T1 Réplica 1 (g/L)	T1 Réplica 2 (g/L)	T1 Promedio (g/L)	T2 Réplica 1 (g/L)	T2 Réplica 2 (g/L)	T2 Promedio (g/L)	T3 Réplica 1 (g/L)	T3 Réplica 2 (g/L)	T3 Promedio (g/L)
0	0.120	0.200	0.160	0.180	0.160	0.170	0.280	0.240	0.260
6	0.360	0.440	0.400	0.300	0.200	0.250	0.240	0.480	0.360
12	0.520	0.500	0.510	0.340	0.340	0.340	0.220	0.560	0.390
18	0.700	0.680	0.690	0.500	1.080	0.790	0.280	0.560	0.420
24	0.980	0.840	0.910	0.720	0.640	0.680	0.460	0.860	0.660
Día	**T4 Réplica 1 (g/L)**	**T4 Réplica 2 (g/L)**	**T4 Promedio (g/L)**	**T5 Réplica 1 (g/L)**	**T5 Réplica 2 (g/L)**	**T5 Promedio (g/L)**	**T6 Réplica 1 (g/L)**	**T6 Réplica 2 (g/L)**	**T6 Promedio (g/L)**
0	0.300	0.300	0.300	0.340	0.340	0.340	0.200	0.240	0.220
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.260	0.400	0.330
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.380	0.520	0.450
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.560	0.680	0.620
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.320	0.740	0.530
Día	**T7 Réplica 1 (g/L)**	**T7 Réplica 2 (g/L)**	**T7 Promedio (g/L)**	**T8 Réplica 1 (g/L)**	**T8 Réplica 2 (g/L)**	**T8 Promedio (g/L)**	**T9 Réplica 1 (g/L)**	**T9 Réplica 2 (g/L)**	**T9 Promedio (g/L)**
0	0.260	0.320	0.290	0.280	0.160	0.220	0.200	0.220	0.210
6	0.380	0.340	0.360	0.300	0.400	0.350	0.000	0.000	0.000
12	0.340	0.500	0.420	0.280	0.440	0.360	0.000	0.000	0.000
18	0.480	0.200	0.340	0.340	0.720	0.530	0.000	0.000	0.000
24	0.420	0.240	0.330	0.580	1.120	0.850	0.000	0.000	0.000

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 3. Tabla de resultados de ficocianina (g/L).

Día	T1 Réplica 1 (g/L)	T1 Réplica 2 (g/L)	T1 Promedio (g/L)	T2 Réplica 1 (g/L)	T2 Réplica 2 (g/L)	T2 Promedio (g/L)	T3 Réplica 1 (g/L)	T3 Réplica 2 (g/L)	T3 Promedio (g/L)
0	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.152	0.152	0.012
6	0.019	0.043	0.031	0.016	0.026	0.021	0.152	0.152	0.023
12	0.095	0.115	0.105	0.053	0.053	0.053	0.152	0.152	0.051
18	0.149	0.118	0.133	0.088	0.094	0.091	0.152	0.152	0.097
24	0.181	0.145	0.163	0.088	0.081	0.085	0.152	0.152	0.094
Día	**T4 Réplica 1 (g/L)**	**T4 Réplica 2 (g/L)**	**T4 Promedio (g/L)**	**T5 Réplica 1 (g/L)**	**T5 Réplica 2 (g/L)**	**T5 Promedio (g/L)**	**T6 Réplica 1 (g/L)**	**T6 Réplica 2 (g/L)**	**T6 Promedio (g/L)**
0	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.022	0.059	0.040
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.082	0.069
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.128	0.114
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.087	0.103	0.095
Día	**T7 Réplica 1 (g/L)**	**T7 Réplica 2 (g/L)**	**T7 Promedio (g/L)**	**T8 Réplica 1 (g/L)**	**T8 Réplica 2 (g/L)**	**T8 Promedio (g/L)**	**T9 Réplica 1 (g/L)**	**T9 Réplica 2 (g/L)**	**T9 Promedio (g/L)**
0	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012
6	0.046	0.039	0.042	0.028	0.061	0.044	0.000	0.000	0.000
12	0.058	0.064	0.061	0.036	0.109	0.072	0.000	0.000	0.000
18	0.109	0.080	0.094	0.071	0.141	0.106	0.000	0.000	0.000
24	0.083	0.067	0.075	0.101	0.174	0.137	0.000	0.000	0.000

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 4. Tabla de resultados del porcentaje (%) de ficocianina.

Día	T1 Réplica 1 (%)	T1 Réplica 2 (%)	T1 Promedio (%)	T2 Réplica 1 (%)	T2 Réplica 2 (%)	T2 Promedio (%)	T3 Réplica 1 (%)	T3 Réplica 2 (%)	T3 Promedio (%)
0	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240
6	2.151	4.380	3.265	1.806	3.031	2.418	1.508	3.354	2.431
12	9.973	11.323	10.648	5.242	5.287	5.264	4.275	6.859	5.567
18	16.443	12.721	14.582	9.772	9.300	9.536	5.908	14.485	10.196
24	17.512	14.236	15.874	8.664	8.697	8.680	4.158	15.500	9.829
Día	**T4 Réplica 1 (%)**	**T4 Réplica 2 (%)**	**T4 Promedio (%)**	**T5 Réplica 1 (%)**	**T5 Réplica 2 (%)**	**T5 Promedio (%)**	**T6 Réplica 1 (%)**	**T6 Réplica 2 (%)**	**T6 Promedio (%)**
0	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.374	6.114	4.244
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	5.484	8.378	6.931
18	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.156	12.993	12.074
24	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10.004	10.866	10.435
Día	**T7 Réplica 1 (%)**	**T7 Réplica 2 (%)**	**T7 Promedio (%)**	**T8 Réplica 1 (%)**	**T8 Réplica 2 (%)**	**T8 Promedio (%)**	**T9 Réplica 1 (%)**	**T9 Réplica 2 (%)**	**T9 Promedio (%)**
0	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240	1.240
6	5.100	4.110	4.605	3.090	6.269	4.680	0.000	0.000	0.000
12	5.842	6.550	6.196	3.780	11.147	7.464	0.000	0.000	0.000
18	12.027	8.879	10.453	7.236	13.466	10.351	0.000	0.000	0.000
24	7.892	6.357	7.125	10.086	17.219	13.652	0.000	0.000	0.000

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 5. Tabla de resultados de consumo de Nitratos NO_3^- (mg/L)

Día	T1 Réplica 1 (mg/L)	T1 Réplica 2 (mg/L)	T1 Promedio (mg/L)	T2 Réplica 1 (mg/L)	T2 Réplica 2 (mg/L)	T2 Promedio (mg/L)	T3 Réplica 1 (mg/L)	T3 Réplica 2 (mg/L)	T3 Promedio (mg/L)
0	141.0	145.0	143.0	102.0	86.0	94.0	115.0	108.0	111.5
6	180.0	183.0	181.5	113.0	87.0	100.0	140.0	133.0	136.5
12	147.0	181.0	164.0	100.0	96.0	98.0	122.0	120.0	121.0
18	153.0	127.0	140.0	97.0	184.0	140.5	112.0	109.0	110.5
24	173.0	192.0	182.5	106.0	109.0	107.5	133.0	95.0	114.0
Día	**T4 Réplica 1 (mg/L)**	**T4 Réplica 2 (mg/L)**	**T4 Promedio (mg/L)**	**T5 Réplica 1 (mg/L)**	**T5 Réplica 2 (mg/L)**	**T5 Promedio (mg/L)**	**T6 Réplica 1 (mg/L)**	**T6 Réplica 2 (mg/L)**	**T6 Promedio (mg/L)**
0	106.0	115.0	110.5	66.0	69.0	67.5	29.0	37.0	33.0
6	117.0	129.0	123.0	151.0	104.0	127.5	56.0	76.0	66.0
12	100.0	89.0	94.5	88.0	69.0	78.5	33.0	51.0	42.0
18	79.0	113.0	96.0	89.0	90.0	89.5	43.0	53.0	48.0
24	115.0	118.0	116.5	93.0	78.0	85.5	55.0	56.0	55.5
Día	**T7 Réplica 1 (mg/L)**	**T7 Réplica 2 (mg/L)**	**T7 Promedio (mg/L)**	**T8 Réplica 1 (mg/L)**	**T8 Réplica 2 (mg/L)**	**T8 Promedio (mg/L)**	**T9 Réplica 1 (mg/L)**	**T9 Réplica 2 (mg/L)**	**T9 Promedio (mg/L)**
0	52.0	52.0	52.0	87.0	78.0	82.5	103.0	122.0	112.5
6	66.0	98.0	82.0	112.0	130.0	121.0	126.0	134.0	130.0
12	81.0	88.0	84.5	103.0	96.0	99.5	146.0	127.0	136.5
18	49.0	83.0	66.0	99.0	94.0	96.5	141.0	109.0	125.0
24	89.0	92.0	90.5	101.0	121.0	111.0	154.0	138.0	146.0

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 6. Tabla de resultados de consumo de amoniaco NH_3 (mg/L)

Día	T1 Réplica 1 (mg/L)	T1 Réplica 2 (mg/L)	T1 Promedio (mg/L)	T2 Réplica 1 (mg/L)	T2 Réplica 2 (mg/L)	T2 Promedio (mg/L)	T3 Réplica 1 (mg/L)	T3 Réplica 2 (mg/L)	T3 Promedio (mg/L)
0	1.50	1.80	1.65	1.40	1.90	1.65	2.20	1.40	1.80
6	13.90	9.70	11.80	3.60	7.00	5.30	2.10	1.50	1.80
12	1.50	1.10	1.30	2.00	1.60	1.80	2.00	1.40	1.70
18	1.20	1.20	1.20	1.70	1.20	1.45	1.50	1.30	1.40
24	1.00	0.80	0.90	1.30	1.50	1.40	6.60	5.70	6.15
Día	**T4 Réplica 1 (mg/L)**	**T4 Réplica 2 (mg/L)**	**T4 Promedio (mg/L)**	**T5 Réplica 1 (mg/L)**	**T5 Réplica 2 (mg/L)**	**T5 Promedio (mg/L)**	**T6 Réplica 1 (mg/L)**	**T6 Réplica 2 (mg/L)**	**T6 Promedio (mg/L)**
0	2.40	2.60	2.50	2.10	2.10	2.10	2.10	2.00	2.05
6	46.50	37.80	42.15	26.20	27.40	26.80	6.50	12.70	9.60
12	31.50	11.40	21.45	23.00	19.60	21.30	1.40	1.20	1.30
18	10.50	8.40	9.45	21.40	18.40	19.90	2.00	1.40	1.70
24	11.00	6.40	8.70	5.20	19.60	12.40	4.40	1.20	2.80
Día	**T7 Réplica 1 (mg/L)**	**T7 Réplica 2 (mg/L)**	**T7 Promedio (mg/L)**	**T8 Réplica 1 (mg/L)**	**T8 Réplica 2 (mg/L)**	**T8 Promedio (mg/L)**	**T9 Réplica 1 (mg/L)**	**T9 Réplica 2 (mg/L)**	**T9 Promedio (mg/L)**
0	0.90	1.00	0.95	0.80	0.90	0.85	2.90	2.70	2.80
6	2.40	3.80	3.10	1.30	1.20	1.25	30.60	30.80	30.70
12	1.30	1.20	1.25	1.40	1.20	1.30	30.40	17.80	24.10
18	2.70	4.20	3.45	1.40	1.30	1.35	28.40	16.80	22.60
24	4.70	3.80	4.25	1.20	1.30	1.25	27.60	17.20	22.40

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 7. Tabla de resultados de consumo de fosfatos PO_4^{3-} (mg/L)

Día	T1 Réplica 1 (mg/L)	T1 Réplica 2 (mg/L)	T1 Promedio (mg/L)	T2 Réplica 1 (mg/L)	T2 Réplica 2 (mg/L)	T2 Promedio (mg/L)	T3 Réplica 1 (mg/L)	T3 Réplica 2 (mg/L)	T3 Promedio (mg/L)
0	93.80	94.00	93.90	86.20	76.80	81.50	88.20	91.00	89.60
6	96.80	85.40	91.10	86.40	82.40	84.40	81.60	87.40	84.50
12	101.20	85.60	93.40	89.00	73.00	81.00	84.40	78.80	81.60
18	101.20	93.20	97.20	71.00	59.60	65.30	83.00	80.40	81.70
24	101.40	86.80	94.10	98.40	58.60	78.50	95.80	88.20	92.00
Día	**T4 Réplica 1 (mg/L)**	**T4 Réplica 2 (mg/L)**	**T4 Promedio (mg/L)**	**T5 Réplica 1 (mg/L)**	**T5 Réplica 2 (mg/L)**	**T5 Promedio (mg/L)**	**T6 Réplica 1 (mg/L)**	**T6 Réplica 2 (mg/L)**	**T6 Promedio (mg/L)**
0	107.00	107.20	107.10	110.00	103.00	106.50	104.40	94.60	99.50
6	99.80	100.00	99.90	94.40	87.20	90.80	96.20	95.00	95.60
12	89.40	91.00	90.20	88.40	92.40	90.40	89.00	94.00	91.50
18	101.40	95.20	98.30	91.40	88.60	90.00	81.40	89.00	85.20
24	89.20	97.00	93.10	99.00	97.80	98.40	96.60	87.80	92.20
Día	**T7 Réplica 1 (mg/L)**	**T7 Réplica 2 (mg/L)**	**T7 Promedio (mg/L)**	**T8 Réplica 1 (mg/L)**	**T8 Réplica 2 (mg/L)**	**T8 Promedio (mg/L)**	**T9 Réplica 1 (mg/L)**	**T9 Réplica 2 (mg/L)**	**T9 Promedio (mg/L)**
0	92.80	93.60	93.20	81.60	93.40	87.50	94.00	82.00	88.00
6	82.80	94.20	88.50	85.20	89.20	87.20	97.00	84.40	90.70
12	91.20	89.80	90.50	91.20	98.60	94.90	95.00	91.80	93.40
18	95.80	92.80	94.30	91.00	91.60	91.30	88.80	85.60	87.20
24	85.20	91.40	88.30	86.00	96.00	91.00	93.20	88.00	90.60

Elaborado por: (La autora, 2023).

Anexo 8.Tabla de resultados de consumo de sulfatos SO_4^{2-} (mg/L)

Día	T1 Réplica 1 (mg/L)	T1 Réplica 2 (mg/L)	T1 Promedio (mg/L)	T2 Réplica 1 (mg/L)	T2 Réplica 2 (mg/L)	T2 Promedio (mg/L)	T3 Réplica 1 (mg/L)	T3 Réplica 2 (mg/L)	T3 Promedio (mg/L)
0	210.0	150.0	180.0	180.0	190.0	185.0	170.0	180.0	175.0
6	310.0	220.0	265.0	190.0	170.0	180.0	190.0	160.0	175.0
12	320.0	310.0	315.0	200.0	220.0	210.0	210.0	230.0	220.0
18	370.0	320.0	345.0	250.0	220.0	235.0	240.0	230.0	235.0
24	300.0	250.0	275.0	360.0	260.0	310.0	280.0	170.0	225.0
Día	**T4 Réplica 1 (mg/L)**	**T4 Réplica 2 (mg/L)**	**T4 Promedio (mg/L)**	**T5 Réplica 1 (mg/L)**	**T5 Réplica 2 (mg/L)**	**T5 Promedio (mg/L)**	**T6 Réplica 1 (mg/L)**	**T6 Réplica 2 (mg/L)**	**T6 Promedio (mg/L)**
0	260.0	190.0	225.0	230.0	220.0	225.0	200.0	210.0	205.0
6	170.0	200.0	185.0	190.0	130.0	160.0	180.0	180.0	180.0
12	210.0	260.0	235.0	190.0	180.0	185.0	210.0	200.0	205.0
18	240.0	230.0	235.0	210.0	240.0	225.0	240.0	220.0	230.0
24	280.0	280.0	280.0	220.0	210.0	215.0	250.0	300.0	275.0
Día	**T7 Réplica 1 (mg/L)**	**T7 Réplica 2 (mg/L)**	**T7 Promedio (mg/L)**	**T8 Réplica 1 (mg/L)**	**T8 Réplica 2 (mg/L)**	**T8 Promedio (mg/L)**	**T9 Réplica 1 (mg/L)**	**T9 Réplica 2 (mg/L)**	**T9 Promedio (mg/L)**
0	200.0	190.0	195.0	180.0	220.0	200.0	180.0	180.0	180.0
6	210.0	160.0	185.0	180.0	210.0	195.0	160.0	150.0	155.0
12	250.0	210.0	230.0	160.0	230.0	195.0	180.0	140.0	160.0
18	230.0	230.0	230.0	210.0	280.0	245.0	180.0	170.0	175.0
24	290.0	230.0	260.0	240.0	320.0	280.0	210.0	150.0	180.0

Elaborado por: (La autora, 2023).