

Información Importante

La Universidad de La Sabana informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad de La Sabana.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento para todos los usos que tengan finalidad académica, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le de crédito al documento y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, La Universidad de La Sabana informa que los derechos sobre los documentos son propiedad de los autores y tienen sobre su obra, entre otros, los derechos morales a que hacen referencia los mencionados artículos.

BIBLIOTECA OCTAVIO ARIZMENDI POSADA
UNIVERSIDAD DE LA SABANA
Chía - Cundinamarca

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE SOLUCIONES DE *CHLORELLA VULGARIS* Y *SCENEDESMUS OBLIQUUS* SOBRE EL CONTENIDO DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN GERMINADOS DE BRÓCOLI (*BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA*)

Tebbie Lin Chacón Lee

Código: 200721691

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Para optar por el título de

Magister en Diseño y Gestión de Procesos

Gloria Eugenia González Mariño. PhD

DIRECTOR

Universidad de La Sabana

Facultad de Ingeniería

Maestría en Diseño y Gestión de Procesos

Bogotá

2010

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen, por llenar nuestras vidas de bendiciones.

A nuestras familias, porque a pesar de la distancia, nos brindan cada vez que nos comunicamos, el apoyo, el ánimo, el amor y la alegría que nos permite tener la fortaleza necesaria para seguir adelante. Por ellos y para ellos!

A nuestros amigos, sin importar su nacionalidad, o el lugar en el que actualmente residen, por su confianza y lealtad.

A nuestro País, Venezuela, porque el gran cariño que le tenemos, nos permite soñar que algún día podremos regresar, y así volver a hacer Patria. Rodeados de su historia, sus tradiciones, sus hermosos paisajes, pero sobre todo su gente.

A la Universidad de la Sabana, en especial al grupo de docentes, personal administrativo, jóvenes investigadores, y técnicos de laboratorio de la Facultad de Ingeniería que hicieron posible la realización de este trabajo de investigación.

Al Fondo Patrimonial y la Dirección de Investigación de la Universidad de la Sabana por el aporte financiero necesario para la materialización del proyecto.

Tebbie Phacón y Jimmy Peña

CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 9 |
| ABSTRAC | 12 |
| INTRODUCCIÓN | 15 |
| 1. OBJETIVOS | 18 |
| 1.1 OBJETIVO GENERAL..... | 18 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 18 |
| 2. ESTADO DEL ARTE..... | 19 |
| 2.1 COMPUESTOS FITOQUÍMICOS..... | 19 |
| 2.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LA ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES | 20 |
| 2.3 ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA LA PROMOCIÓN DE SUSTANCIAS FITOQUÍMICAS EN VEGETALES..... | 21 |
| 2.4 VARIABILIDAD DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS POR EFECTOS GENÉTICOS, AMBIENTALES, E INTRÍNSECOS EN VEGETALES Y HORTALIZAS | 23 |
| 2.4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE | 23 |
| 2.4.2 B-CAROTENO..... | 25 |
| 2.4.3 ÁCIDO ASCÓRBICO | 27 |
| 2.4.4 GLUCOSINOLADOS Y SULFORAFANE..... | 30 |
| 2.5 EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE EL CONTENIDO DE NUTRIENTES EN VEGETALES Y HORTALIZAS | 39 |
| 2.5.1 FERTILIZACIÓN CON MICROORGANISMOS..... | 42 |
| 2.5.2 LAS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA PARA LA FERTILIZACIÓN DE CULTIVOS..... | 43 |
| 3. METODOLOGÍA | 48 |
| 3.1 PRODUCCIÓN DE LAS MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS UTEX 265 Y SCENEDESMUS OBLIQUUS UTEX 393..... | 48 |
| 3.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE MICROALGAS: | 51 |
| 3.3 APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE MICROALGAS | 52 |
| 3.4 ANÁLISIS DE FITOQUÍMICOS EN LA MATERIA VEGETAL: | 54 |
| 3.4.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 3.4.2 DETERMINACIÓN DE B-CAROTENO | 55 |
| 3.4.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C) | 56 |
| 3.4.4 DETERMINACIÓN DE SULFORAFANE | 56 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 58 |
| 4.1 CONTENIDO DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN BRÓCOLI | 58 |
| 4.1.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE | 58 |
| 4.1.2 CONTENIDO DE B-CAROTENO | 61 |
| 4.1.3 CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO..... | 64 |
| 4.1.4 CONTENIDO DE SULFORAFANE | 66 |
| 4.2 MEDIDAS DE CRECIMIENTO EN GERMINADOS DE BRÓCOLI | 71 |
| 4.2.1 LONGITUD DE TALLO DE GERMINADOS..... | 71 |
| 4.2.2 LONGITUD DE RAÍZ DE GERMINADOS | 72 |
| 4.2.3 PESO FRESCO DE GERMINADOS | 73 |
| 4.2.4 PESO SECO DE GERMINADOS..... | 75 |
| 4.3 COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS | 77 |
| 4.4 IMPACTOS DEL PROYECTO Y PROPUESTAS A FUTURO..... | 80 |
| 5. CONCLUSIONES | 82 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 84 |
| ANEXOS | 89 |
| ANEXO 1- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS..... | 89 |
| ANEXO 1.1- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS SOBRE CONTENIDOS DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN GERMINADOS DE BRÓCOLI..... | 89 |
| ANEXO 1.1.1- DATOS SOBRE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE..... | 89 |
| ANEXO 1.1.2 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE B-CAROTENO..... | 90 |
| ANEXO 1.1.3 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO | 91 |
| ANEXO 1.1.4 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE SULFORAFANE | 92 |
| ANEXO 1.2- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS SOBRE ASPECTOS DE CRECIMIENTO EN GERMINADOS DE BRÓCOLI..... | 93 |
| ANEXO 1.2.1 - DATOS SOBRE ALTURA DE GERMINADOS | 93 |
| ANEXO 1.2.2 - DATOS SOBRE LONGITUD DE RAÍZ DE GERMINADOS | 94 |
| ANEXO 1.2.3 - DATOS SOBRE PESO FRESCO DE GERMINADOS | 95 |

| | |
|--|----|
| ANEXO 1.2.4 - DATOS SOBRE PESO SECO DE GERMINADOS | 96 |
| ANEXO 2.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO REALIZADO A LOS DATOS RECOPILADOS EN EL PROYECTO, CON UN FACTOR DE SIGNIFICANCIA DE 0.05..... | 97 |

TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Contenido de carotenoides en vegetales de la familia <i>Brasicáceas</i> (mg/100g porción comestible) de acuerdo a estudios realizados por diferentes autores (Podsdek 2007) | 26 |
| Tabla 2 Valores promedio, desviación estándar, y máximos y mínimos de compuestos de interés en brócoli expresados en mg/100g peso fresco (Schonfof et al. 2007) | 27 |
| Tabla 3 Contenido de ácido ascórbico en vegetales del tipo crucíferas tomado de (Podsdek 2007) expresado en mg/100g porción comestible..... | 29 |
| Tabla 4 Contenido de sulforafane en 18 especies de brócoli y repollo (Liang et al., 2006)..... | 33 |
| Tabla 5 Concentración de sulforafane en muestras de brócoli comercial (Nakagawa et al. 2006)..... | 34 |
| Tabla 6 Concentración de glucorafanina ($\mu\text{mol/g}$ PS) en diferentes etapas de crecimiento de dos genotipos de <i>B. oleracea</i> var. <i>Itálica</i> (brócoli) (tomado de Rangkadilok et al., 2002)..... | 35 |
| Tabla 7 Contenido de sulforafane en algunas semillas de especies de crucíferas (Liang et al., 2005)..... | 36 |
| Tabla 8 Contenido de sulforafane en especies europeas de <i>Brassicaceae</i> y su variabilidad con el crecimiento de la plántula (Tomado de Sivakumar et al., 2007) | 38 |
| Tabla 9 Composición aproximada de las microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> empleadas en los tratamientos aplicados a los germinados de brócoli, expresados como %N de peso seco. | 43 |
| Tabla 10 Composición de aminoácidos de la proteína de las microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus obliquus</i> | 45 |
| Tabla 11 Composición del medio de cultivo Bristol modificado, fuente: UTEX..... | 48 |
| Tabla 12 Descripción de los tratamientos aplicados a las semillas de brócoli empelados en la evaluación del efecto de los mismos sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados. | 52 |
| Tabla 13 Cuadro resumen del contenido de compuestos fitoquímicos de germinados de brócoli de 7 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control | 77 |
| Tabla 14 Cuadro resumen del contenido de compuestos fitoquímicos de germinados de brócoli de 14 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control..... | 77 |
| Tabla 15 Cuadro resumen de medidas de crecimiento en germinados de brócoli de 7 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control | 78 |
| Tabla 16 Cuadro resumen de medidas de crecimiento en germinados de brócoli de 14 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control | 79 |
| Tabla 17 Actividad antioxidante de germinados de 7 días, expresado como % de capacidad reductora de DPPH. | 89 |
| Tabla 18 Actividad antioxidante de germinados de 14 días, expresado como % de capacidad reductora de DPPH | 89 |
| Tabla 19 Datos sobre el contenido de B-carotenos en germinados de 7 días expresado en mg.L^{-1} | 90 |
| Tabla 20 Datos sobre contenido de b-carotenos en germinados de 14 días expresado en mg.L^{-1} | 90 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 21 Contenido de b-carotenos en germinados de 7 días, expresados en mg/100g PF..... | 90 |
| Tabla 22 Contenido de β -Caroteno en germinados de 14 días expresado en mg/100g PF..... | 90 |
| Tabla 23 Datos sobre contenido de ácido ascórbico de germinados de 7 días, expresado como mg.L ⁻¹ | 91 |
| Tabla 24 Contenido de ácido ascórbico de germinados de 14 días, expresado como mg.L ⁻¹ | 91 |
| Tabla 25 Contenido de ácido ascórbico en germinados de 7 días, expresado como mg/100g PF..... | 91 |
| Tabla 26 Contenido de ácido ascórbico en germinados de 14 días expresado en mg/100g PF..... | 91 |
| Tabla 27 Efecto de la aplicación de extractos de microalgas sobre el contenido de sulforafane ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) en germinados de brócoli a los 14 días de sembrados..... | 92 |
| Tabla 28 Contenido de sulforafane en germinados de 14 días (mg.mg ⁻¹ PS)..... | 92 |
| Tabla 29 Datos sobre Altura de germinados de 7 días, expresado en mm..... | 93 |
| Tabla 30 Datos de la Altura de germinados de 14 días, expresados en mm..... | 93 |
| Tabla 31 Datos de longitud de raíz de germinados de 7 días expresado en mm..... | 94 |
| Tabla 32 Datos de longitud de raíz de germinados de 14 días, expresado en mm..... | 94 |
| Tabla 33 Datos sobre peso fresco de germinados (3 unidades por réplica) de 7 días, expresado en g..... | 95 |
| Tabla 34 Datos de peso fresco de germinados de 14 días, expresados en g..... | 95 |
| Tabla 35 Datos peso seco (3 germinados por réplica) de germinados de 7 días, expresado en g..... | 96 |
| Tabla 36 Datos de peso seco (3 germinados por replica) de germinados de 14 días, expresado en g..... | 96 |
| Tabla 37 Resultados de ANOVA para altura de germinados de 7 días..... | 98 |
| Tabla 38 Resultado de ANOVA de un factor para datos Altura de tallo para germinados de 14 días..... | 98 |
| Tabla 39 Resultados de ANOVA de un factor para longitud de raíz de germinados de 7 días..... | 99 |
| Tabla 40 Resultado de ANOVA de un factor para datos Longitud de raíz de germinados de 14 días..... | 99 |
| Tabla 41 Resultado de ANOVA de un factor para peso fresco de germinados de 7 días..... | 100 |
| Tabla 42 Resultado de ANOVA de un factor para datos de Peso fresco de germinados de 14 días..... | 100 |
| Tabla 43 Resultados ANOVA de un factor para peso seco de germinados de 7 días..... | 101 |
| Tabla 44 Resultado de ANOVA de un factor para datos peso seco de germinados de 14 días..... | 101 |
| Tabla 45 Resultados del ANOVA de un factor realizado a los datos de capacidad antioxidante de plantas de 7 días..... | 102 |
| Tabla 46 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre capacidad antioxidante de germinados 14 días..... | 102 |
| Tabla 47 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de β -Caroteno de germinados 7 días..... | 103 |
| Tabla 48 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de β -Caroteno de germinados 14 días..... | 103 |
| Tabla 49 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de Ácido Ascórbico de germinados 14 días..... | 104 |
| Tabla 50 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de Sulforafane de 14 días..... | 104 |
| Tabla 51 t-test: Paired Two samples for Means of Sulforaphane content in 14 days plants against Control treatment (Agua) significance value 0.05..... | 105 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Estructura de la enzima mirosinasa EC 3.2.3.1 tomado de: | 31 |
| Figura 2 Proceso de degradación de la Glucorafanina para producir Sulforafane (Nakagawa et al. 2006) | 32 |
| Figura 3 Microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (izquierda), <i>Scenedesmus obliquus</i> (derecha). Foto tomada en los laboratorios de la facultad ingeniería de la Universidad de La Sabana. | 44 |
| Figura 4 Fotobioreactores de columna de burbujeo de 5L de capacidad, fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana. | 49 |
| Figura 5 Biomasa liofilizada de microalgas <i>Chlorella vulgaris</i> (izquierda) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (derecha). Fotografía tomada en los laboratorios de ingeniería de la Universidad de La Sabana | 51 |
| Figura 6 Germinados de brócoli cultivados sobre soluciones de tratamiento con microalgas. Fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana | 53 |
| Figura 7 Ejemplo de medidas de altura y longitud de raíz de los germinados para análisis por imágenes. Fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana | 54 |

GRÁFICAS

| | |
|--|----|
| Gráfica 1 Capacidad antioxidante promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresada como % de capacidad reductora de DPPH..... | 59 |
| Gráfica 2 Capacidad antioxidante promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresada como % de capacidad reductora de DPPH | 60 |
| Gráfica 3 Contenido promedio de β -caroteno en germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg/100g PF..... | 62 |
| Gráfica 4 Contenido promedio de β -carotenos en germinados de brócoli de 14 días expresados como mg/100g PF..... | 63 |
| Gráfica 5 Contenido de ácido ascórbico promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado como mg/100g PF..... | 65 |
| Gráfica 6 Contenido Promedio de ácido ascórbico en germinados de brócoli de 14 días expresado como mg/100g PF..... | 65 |
| Gráfica 7 Contenido promedio de sulforafane en germinados de brócoli de 14 días, expresado como mg/100g PS..... | 67 |
| Gráfica 8 Promedio de la longitud de los germinados de brócoli de 7 días expresados en mm | 71 |
| Gráfica 9 Longitud promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mm..... | 72 |
| Gráfica 10 Longitud de raíz promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mm | 73 |
| Gráfica 11 Longitud de raíz promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mm. | 73 |
| Gráfica 12 Peso fresco promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg | 74 |
| Gráfica 13 Peso fresco promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mg | 74 |
| Gráfica 14 Peso seco promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg | 75 |
| Gráfica 15 Peso seco promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mg | 76 |

RESUMEN

Hoy día, se presentan dos tendencias muy importantes en el ámbito alimentario, mantener la productividad de los cultivos empleando tecnologías ambientalmente sustentables, y la necesidad de los consumidores de mantener y mejorar su salud empleando alternativas naturales. La tendencia hacia la agricultura sustentable hace referencia a diversos aspectos, desde evitar la tala de bosques, proteger ecosistemas y la biodiversidad en todas las regiones, como de proteger la salud de los consumidores, agricultores y los suelos cultivados, mediante la reducción del uso de pesticidas, herbicidas y fertilizantes químicos. La segunda parte de la nueva tendencia entre consumidores, se refiere a la protección de la salud en vez de solamente curar enfermedades, permitiendo que los productos ricos en compuestos funcionales, minerales y vitaminas sean de especial interés para estos consumidores. Unificar la producción agrícola sustentable y productos ricos en compuestos saludables, es por lo tanto, una alternativa muy interesante para la economía y bienestar de la sociedad.

Existe evidencia que vincula factores genéticos, ambientales y la calidad de los nutrientes a los que tienen acceso las plantas durante su crecimiento, con la posibilidad de producir un efecto de promoción en el contenido de compuestos fitoquímicos funcionales en dichas plantas. Por lo tanto, la búsqueda y aplicación de fuentes de nutrición ambientalmente amigables para los cultivos vegetales constituyen una de las alternativas propuestas para la mejora del valor nutricional de los productos agrícolas que más se ajusta a las tendencias mundiales de los consumidores.

Las microalgas se han evaluado por su capacidad promotora de crecimiento en diversos cultivos como maíz, trigo, arveja, tabaco, lechuga y uvas vinícolas. En estas evaluaciones se demostró que el contenido nutricional de estas microalgas, así como la presencia de sustancias promotoras de crecimiento, brindaban a las microalgas la capacidad de mejorar la resistencia de los cultivos a condiciones salinas, a incrementar la productividad y la calidad de los frutos. El contenido nutritivo de las microalgas abre la posibilidad a la

promoción de compuestos funcionales en productos agrícolas, pero se han encontrado muy pocas referencias a estudios desarrollados con la expresa finalidad de evaluar el contenido de compuestos funcionales como respuesta al empleo de microalgas como sustancias nutritivas en cultivos agrícolas.

En este proyecto se planteó la evaluación del efecto del uso de tratamientos microalgas como fuente nutritiva, sobre el contenido de compuestos fitoquímicos funcionales en germinados de brócoli.

Se utilizaron 10 soluciones de tratamiento preparados a partir de los cultivos de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*. Se emplearon soluciones con concentraciones de 1g.L^{-1} y 2g.L^{-1} de células liofilizadas de cada microalga en agua (ChAg1, ChAg2, ScAg1 y ScAg2), 1g.L^{-1} y 2g.L^{-1} de células liofilizadas en el sobrenadante del medio de cultivo gastado de cada microalga (ChSo1, ChSo2, ScSo1 y ScSo2), y los sobrenadantes de cada cultivo de microalga sin células (ChSo y ScSo), como control se utilizó agua destilada estéril y un fertilizante comercial (Agua y Fert). Estos 10 tratamientos se aplicaron a semillas de brócoli para evaluar el contenido de los compuestos funcionales β -caroteno, ácido ascórbico, sulforafane y actividad antioxidante en los germinados obtenidos a los 7 y 14 días de cultivo.

Se encontró que en los germinados de 7 días, hubo incrementos en la capacidad antioxidante por DPPH de los germinados obtenidos con los tratamientos Fert, ChAg1, ChAg2, ChSo, ChSo1, ScAg2 y ScSo1 respecto al control (Agua), pero no hubo diferencias significativas en los resultados de los de 14 días. En el contenido de β -caroteno, de igual manera solo se observaron diferencias significativas en los germinados de 7 días, para los tratamientos ChAg1 y ChSo2 con un incremento en contenido de este compuesto frente al control de agua.

En lo que respecta al efecto sobre el contenido de ácido ascórbico, se encontró que los tratamientos ScSo, ChAg2, ScAg1 y ChSo presentaron concentraciones significativamente superiores a las del tratamiento control (Agua). Encontrándose un incremento en la concentración de hasta un 37% en los germinados de 7 días, y superiores al 100% en los de

14 días. En cuanto al contenido de sulforafane, el tratamiento ChSo1 presentó un incremento en la concentración de sulforafane de un 100% frente a la de la encontrada en los germinados con el tratamiento control.

Estos resultados indican la potencialidad de las soluciones de microalgas de mejorar el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli, pero sin una clara distinción de un solo tratamiento que mejore todos los compuestos funcionales, aunque las soluciones ChSo, ChSo1 y ScAg1, se perfilaron como buenas candidatas como soluciones nutritivas promotoras de crecimiento y del contenido de sustancias fitoquímicas en los germinados de brócoli.

ABSTRAC

Nowadays there's two main trends in the food sector, keeping the productivity of food crops by way of using sustainable technologies, and the need of consumers to keep and improve their health using natural alternatives. The trend towards sustainable agriculture refers to different aspects that range from preventing the destruction of forests, protecting ecosystems and biodiversity in all regions, to the protection of consumer health, agriculture and cultivated soils, with the reduction of pesticide use, herbicides and chemical fertilizers. The second part of this new trend among consumers refers to the protection of their health as opposed to only curing existing diseases, allowing for functional rich products, minerals and vitamins to become of increasing importance to consumers. Unifying the sustainable agricultural production and healthy products, is therefore, an interesting alternative for society's economy and wellbeing.

There's evidence that suggests a link between genetic, environmental and quality of the nutrients that are available to plants during their growth and development with the possibility to promote the amount of functional compounds in these plants. Therefore, searching and providing plants with environmentally friendly nutrition sources to vegetable crops constitutes one of the proposed alternatives to increase the nutritional quality of agriculture products that best adjusts to world trends.

Microalgae have been evaluated for their growth promoting capacity in various crops like corn, wheat, peas, tobacco, lettuce and grapes. These studies show that the nutritional content of microalgae as well as the presence of substances that promote growth, allow microalgae to increase plant resistance to saline environments, as well as increase the productivity and quality of products. The nutritional content of microalgae opens the possibility to increase the amount of functional compounds in agronomic products, but few research papers have been found to refer to this subject, specifically those referring to the promotion of functional compounds as a consequence of the use of microalgae as a nutrition source for vegetable products.

The aim of this project is to evaluate the effect of using treatments with microalgae solutions as a nutrient source, on the amount of functional phytochemicals in broccoli sprouts.

10 treatment solutions were prepared from cultures of microalgae species *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus*. Concentration of these solutions were 1g.L⁻¹ and 2g.L⁻¹ of freeze dried cells of each microalgae in water (ChAg1, ChAg2, ScAg1 and ScAg2), 1g.L⁻¹ y 2g.L⁻¹ of freeze dried cells in supernatant of the spent media culture from each microalgae (ChSo1, ChSo2, ScSo1 and ScSo2), as well as the spent supernatant of the culture media without microalgae cells (ChSo and ScSo), as a control, sterilized distilled water was used as well as a commercial fertilizer (Agua and Fert). These 10 treatments were applied to broccoli seeds to evaluate the content of functional compounds like β -carotene, ascorbic acid, sulforaphane and antioxidant activity in 7 and 14 day old sprouts.

In 7 day old sprouts there was an increase in antioxidant capacity measured with DPPH in sprouts treated with Fert, ChAg1, ChAg2, ChSo, ChSo1, ScAg2 and ScSo1 when compared with the control (Agua), but there were no meaningful difference in the 14 day old sprouts. Regarding the content of β -carotene, there were also, only significant differences in 7 day old sprouts, for treatments ChAg1 and ChSo2 observing an increase in the amount of this compound compared with the control.

Regarding the effect of treatments on the content of ascorbic acid, the results show that treatments ScSo, ChAg2, ScAg1 and ChSo produced an increase in concentration of this compound superior to that of the control. An increase of up to 37% was found in 7 day old sprouts and up to a 100% increase in those of 14 day old sprouts. Regarding the content of sulforaphane, treatment ChSo1 produced an increase in concentration of this compound of up to a 100% than what is found in the control grown sprouts.

These results show the potential of microalgae solutions to increase the content of functional compounds in broccoli sprouts, but without a clear distinction among treatments as a best treatment option. Even so, solutions ChSo, ChSo1 and ScAg1, are good

candidates to be used in future studies as growth promoting and functional promoting nutritive substrates for broccoli sprouts.

INTRODUCCIÓN

Luego de una amplia revisión en la literatura, se puede afirmar que las microalgas tienen el potencial de ayudar a incrementar la productividad de los cultivos vegetales (Faheed y Abd-El Fattah 2008; Shaaban 2001a; Shaaban 2001b). Existe evidencia que las microalgas y sus medios de cultivo contienen sustancias promotoras de crecimiento denominadas fitohormonas (Molnar y Ördög 2005; Stirk et al. 2002), además poseen un contenido interesante de micro y macro nutrientes (Becker 2007), los cuales en conjunto, tienen el potencial de mejorar la disponibilidad de nutrientes, pudiendo promover cultivos más robustos y saludables. El suministrar condiciones más nutritivas durante el cultivo de verduras y hortalizas, favorece la obtención no solamente de cultivos más productivos, como ocurre en la fertilización convencional con productos agroquímicos, sino que podría promover la síntesis de sustancias nutricionales y funcionales de interés para el cuidado y mejora de la salud de los consumidores (Martínez-Ballesta et al. 2008).

El brócoli, es una hortaliza de la familia de crucíferas, las cuales son reconocidas por su potencial actividad en la prevención de enfermedades cancerígenas, cardiovasculares y respiratorias. Se ha reportado, que el consumo de brócoli y germinados de semillas de brócoli, puede influir en la reducción del riesgo a contraer cáncer de pulmón, ovarios, mama, próstata, vejiga, y páncreas, puede contribuir de igual manera a disminuir la posibilidad de desarrollar diabetes, enfermedades cardiovasculares, y enfermedades respiratorias, así como puede reforzar el sistema inmunológico y ayudar a reparar algunas lesiones cerebrales (Shapiro et al. 2001).

En un estudio realizado sobre la mortalidad por cáncer en Colombia en el año 2001 (Instituto Nacional de Salud 2001; Ochoa Jaramillo y Montoya Vélez 2004), se encontraron 28.279 muertes con cáncer como la causa principal, esto corresponde con el 14.7% de las muertes totales del país. En el año 2005, en Colombia, se reportaron 56 nuevos casos de cáncer de vejiga, 129 de cáncer de ovario, 135 casos de personas afectadas con cáncer de bronquios y pulmón, 357 con cáncer de próstata, y 708 con cáncer de mama, constituyendo

alrededor del 23% de los casos nuevos de cáncer reportados en dicho año . El Ministerio de Protección Social, señaló (2003), que el cáncer se está convirtiendo en una de las más importantes causas de muerte en Colombia y que este hecho es producto de diversos aspectos, entre los que se pueden citar la transición demográfica y epidemiológica, inadecuados estilos de vida y patrones nutricionales. Por ende, puede resultar beneficioso proveer a la comunidad con alternativas naturales de prevención de esta enfermedad, como la disponibilidad de vegetales con alto contenido de sustancias quimo-protectoras, como el sulforafane, presente en el brócoli y sus germinados (Fahey et al. 1997).

Actualmente, la producción de brócoli en el país es muy reducida, y su consumo es aún menor. Pero los beneficios potenciales del consumo de brócoli sobre la salud humana, son un factor de interés de salud pública (Shapiro et al. 2001), haciendo de alguna manera, que el cultivo de esta hortaliza, posea un gran potencial para generar beneficios económicos. La sabana de Bogotá posee condiciones climáticas favorables y este vegetal fue incluido en las estrategias de desarrollo del sector agrícola, con una ventaja competitiva como rubro de exportación. Los germinados no son un producto común en el país, pero sus beneficios para la salud podrían lograr incentivar a un consumo más regular si la población recibe la información adecuada, tal y como ha ocurrido en Estados Unidos y algunos países Europeos, donde se incorporan con frecuencia en sandwiches y ensaladas, o como en el caso de Australia, donde se comercializan cápsulas y pastillas de germinados de brócoli como nutraceuticos, y donde actualmente se están llevando a cabo las primeras pruebas clínicas en vivo con cápsulas de polvo de germinados de brócoli, para evaluar su actividad antioxidante y contra cáncer (The University of Queensland 2009).

Los germinados en general, tienen la ventaja de requerir de corto tiempo de cultivo, una muy pequeña infraestructura, y no requerir extensiones de tierras cultivables, puesto que su cultivo se realiza hidropónicamente. Estas ventajas proveen al productor con la ventaja competitiva de tener una alta rotación. Adicionalmente, los germinados tienen la particularidad de no tener el aspecto común de los vegetales, y por ende más fácil de consumir, no requieren cocción, y que en una muy pequeña porción pueden suministrar los

mismos o mayores beneficios a la salud que la inflorescencia tradicional (Martínez-Villaluenga et al. 2008).

En este trabajo se buscó evaluar la posibilidad de utilizar soluciones de microalgas como promotoras del contenido de compuestos fitoquímicos en vegetales, utilizando como caso de estudio los germinados de brócoli. Se seleccionaron los germinados para evaluar el potencial de las soluciones de microalgas por dos razones fundamentales, primero, por la posibilidad de evaluar el contenido de compuestos fitoquímicos en un periodo de tiempo corto, y segundo por el interesante comportamiento que tienen los germinados de presentar en sus tejidos una mayor concentración (de hasta 10 veces superior) del bioactivo sulforafane que en la inflorescencia tradicionalmente consumida (Bellostas et al. 2007), significando la posibilidad de una actividad promotora de salud de los germinados igual o superior a la atribuida al brócoli. En los germinados se evaluó el contenido de β -caroteno, ácido ascórbico, sulforafane y la actividad antioxidante de los germinados al cultivarlos sobre soluciones preparadas con las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la aplicación de soluciones de microalgas sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli, mediante la cuantificación comparativa de β -Carotenos, ácido ascórbico, sulforafane y actividad antioxidante en los germinados de brócoli cultivados con dichas soluciones.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli, producidos con y sin tratamientos de extractos de microalgas para identificar variaciones en el contenido de, β -carotenos, ácido ascórbico, sulforafane, y actividad antioxidante.
- Caracterizar las potencialidades de los diferentes extractos de microalgas evaluados como alternativa para el incremento del contenido de compuestos funcionales en los germinados.

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 COMPUESTOS FITOQUÍMICOS

En años recientes, se ha empezado a prestar mayor atención a la composición de la dieta diaria, puesto que varios estudios han asociado el consumo de productos de origen vegetal como verduras y hortalizas con la reducción del riesgo a sufrir varias enfermedades crónicas, como cáncer y problemas cardiovasculares, entre otros (Nautiy et al. 2008). Los potenciales beneficios para la salud, atribuidos al consumo de ciertas verduras y vegetales, se deben a la presencia en dichos productos de compuestos bioactivos, conocidos como fitoquímicos. Estos compuestos bioactivos, engloban una gran cantidad de fitoquímicos no esenciales para la dieta, pero que en cantidades suficientes, promueven la buena salud del consumidor (Martínez-Ballesta et al. 2008).

Los compuestos fitoquímicos, varían tanto en estructura química como en función. Se agrupan en carotenoides, compuestos fenólicos, glucosinolados, saponinas, sulfídicos, fitoesteroles, fitoestrógenos, monoterpenos, e inhibidores de proteasa. Estos compuestos, poseen funciones importantes en la interacción de las plantas con su ambiente, como atractivos de polinización, compuestos de protección contra patógenos o estrés abióticos, antioxidantes, entre otros (Shahidi 2004). Muchos de estos compuestos se encuentran presentes en un amplio rango de especies vegetales como es el caso de los polifenoles y carotenoides, mientras que otros están distribuidos solo entre algunos grupos limitados, como es el caso de los glucosinolados, los cuales solo se encuentran en cultivos de crucíferas, o como los sulfídicos, que se restringen a los vegetales del tipo *Liliaceae* (Schreiner 2005).

Estos fitoquímicos de interés poseen funciones capaces de prevenir enfermedades, pueden tener actividad antioxidante, influir sobre la presión arterial, regular el contenido de azúcar en la sangre, reforzar el sistema inmune, actuar como agentes anti-cancerígenos y anti-

bacterianos, ayudar a reducir el colesterol en la sangre, o tener actividad anti-inflamatoria, por mencionar algunos (Shahidi 2004). Los vegetales, son naturalmente ricos en estos compuestos fitoquímicos, por ello, se han desarrollado numerosos estudios epidemiológicos buscando proveer amplia y suficiente evidencia científica sobre el alcance del efecto protector que ejerce el consumo de vegetales frescos contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares de importancia, por ser enfermedades de alta incidencia en la población mundial (Schreiner 2005).

2.2 DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE LA ACTIVIDAD DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Definido de una manera muy amplia, un antioxidante es un compuesto que inhibe o retarda la oxidación de un sustrato, aun si el compuesto está presente en una concentración mucho menor que el sustrato sujeto a oxidación (Halliwell 1995). A nivel celular la protección antioxidante es provista por numerosas enzimas y antioxidantes endógenos de bajo peso molecular tales como el ácido ascórbico, el ácido úrico, los tocoferoles y muchos otros. Muchos compuestos poseen actividad antioxidante adicional a su función fisiológica especializada, y su importancia como antioxidantes es a veces ambigua (Azzi et al. 2004).

Existen varios métodos, unos simples y otros complejos, para medir la actividad antioxidante de un compuesto. Los métodos más sencillos, incluyen la reacción con radicales coloreados estables como 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS utilizado para la prueba TEAC — Trolox equivalent antioxidant capacity) (Re et al. 1999), and DPPH; (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radical) (Molyneux 2004), al igual que la reducción de metales de transición monitoreados por colorimetría. Los métodos basados en metales, incluyen la reducción de iones férricos: FRAP — (ferric reducing ability of plasma), y ensayos con tiocianato férrico (Halliwell 1995), así como el ensayo de ion molibdeno — phosphomolybdenum (P-Mo) (Prieto et al. 1999). Estas pruebas son fáciles y relativamente económicas para emplearse cuando se requieren analizar gran

cantidad de muestras, la principal desventaja de estos métodos es su baja relevancia en situaciones reales. Estos problemas se eliminan empleando métodos basados en especies reactivas oxigenadas naturales, pero se requieren técnicas mucho más costosas y generalmente no disponibles en la mayoría de los laboratorios (Matkowski 2008).

2.3 ALTERNATIVAS TECNOLÓGICAS PARA LA PROMOCIÓN DE SUSTANCIAS FITOQUÍMICAS EN VEGETALES

El potencial efecto promotor y protector de la salud que se ha encontrado en vegetales, frutas y hortalizas, sirve de base para que varios autores puedan afirmar que la optimización de la composición de frutas y vegetales puede constituir un método económicamente muy eficiente para prevenir enfermedades (Martínez-Ballesta et al. 2008; Schreiner 2005). Desde el punto de vista económico mundial, actualmente sufriendo de enormes déficits, entre otras cosas, a causa de altos gastos en salud pública, ha llamado a algunos gobiernos a considerar el desarrollo de políticas gubernamentales de promoción de buenos hábitos alimenticios sumada a una campaña informativa sobre productos naturales con beneficios para la salud (Schreiner 2005).

La idea de estas políticas es mejorar el estado de salud de sus habitantes y prevenir así la epidemia de enfermedades cardiovasculares, diabetes, hipercolesteremia, y obesidad entre otros, que afecta una gran proporción de habitantes de estos países, como es el caso de Estados Unidos (Scott-Thomas 2010). En algunos países, sobre todo europeos, el cambio de política no siempre ha tenido su origen en iniciativas gubernamentales, al contrario, existe un numeroso porcentaje de consumidores exigiendo a las agencias reguladoras y a la industria alimentaria productos de mayor calidad, con mejor calidad nutricional, con compuestos funcionales, y con menor contenido calórico (Halliday 2010b). Se observa una tendencia marcada hacia lo natural, y aunque no siempre esté muy claro el concepto de natural, la percepción de que lo natural es mejor es innegable (Halliday 2010a). Indudablemente, en el pensamiento del consumidor, las frutas y vegetales, siempre y

cuando no sean genéticamente modificadas, son consideradas naturales, y por ende saludables (Halliday 2010c).

Por ello, y para satisfacer la nueva demanda por productos naturales y ricos en compuestos funcionales capaces de promover un mejor estado de salud se han propuesto varias alternativas para lograr una optimización de la composición de productos agrícolas.

En los últimos 50 años, las prácticas agrícolas se han enfocado en el incremento de la productividad de los cultivos, para lograr abastecer la creciente demanda, pero, hoy día, aunque sigue vigente la necesidad de incrementar la productividad de los cultivos, también surge la necesidad de incrementar el acceso a estos compuestos fitoquímicos, bien sea incrementando el contenido de ellos en vegetales frescos, o por su introducción en productos derivados de vegetales (Martínez-Ballesta et al. 2008).

Una de las maneras más comunes de incrementar el contenido de fitoquímicos en especies vegetales, es el cruce entre variedades, sea realizada por agricultores o por científicos. Otra alternativa es la modificación genética para incentivar una mayor producción de sustancias de interés o una reducción de compuestos antinutrientes. Pero esta alternativa no siempre es bien vista por el consumidor e inclusive por el productor. La tercera alternativa es la promoción de la producción de estas sustancias de interés mediante el adecuado manejo de las condiciones de cultivo, como la iluminación, el tipo y cantidad de fertilización, la climatización de los cultivos, el tipo de sustrato sobre el que se producen, la temperatura y la estación del año entre otras (Moreno et al. 2006; Schreiner 2005).

Es en esta tercera alternativa que se enfoca este trabajo, evaluando tres compuestos de interés, el contenido de β -caroteno, ácido ascórbico, y sulforafane, así como la capacidad antioxidante de germinados cultivados empleando tratamientos preparados a partir del cultivo de microalgas como fuente de nutrientes para el cultivo de germinados de brócoli.

Los germinados de vegetales del tipo *Brassicaceae*, tienen la particularidad de contener en esta temprana etapa un contenido de compuestos fitoquímicos mucho más elevados que en las partes tradicionalmente consumidos, como inflorescencias u hojas maduras,

reportándose en algunos casos en germinados concentraciones de glucosinolados de hasta 10 veces más altas (Shapiro et al. 2001), por ello, se promueven como un nuevo alimento funcional, con todos los beneficios que se han atribuido a sus respectivas variedades, así en el mercado estadounidense se puede observar la venta de Broccosprouts®, comercializados en base a su alto contenido de sulforafane frente al contenido de brócoli comercial. La patente dada a este producto en (Fahey y Talalay 1998) ha resultado muy controversial en Estados Unidos, puesto que se reservan todos los derechos referidos a la producción de germinados de brócoli, con contienda legal con otros productores de germinados, quienes insisten en que la producción de germinados es del dominio público, y que por ende no deben requerir licenciar sus productos, pero la Oficina de Patentes Estadounidense mantiene la validez de la misma (TS 2001).

2.4 VARIABILIDAD DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FITOQUÍMICOS POR EFECTOS GENÉTICOS, AMBIENTALES, E INTRÍNSECOS EN VEGETALES Y HORTALIZAS

2.4.1 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

De manera general, las diferentes metodologías normalmente empleadas para determinar actividad o capacidad antioxidante, se pueden clasificar en dos grupos básicos: pruebas con sustratos lipofílicos y en pruebas con sustratos hidrofílicos. En el trabajo de Kurilich (2002) se mostró que aunque ambos tipos de extractos del brócoli presentaron capacidad antioxidante, los extractos de este tipo, fueron responsables de entre un 80 y un 95% de la capacidad antioxidante total cuando se empleó la metodología ORAC, aunque señalaron que sus resultados de los extractos lipofílicos deberían utilizarse con cautela por la poca afinidad del método con ellos. De igual manera, en el estudio de Kurilich et al. (2002) se reportaron diferencias significativas en los valores ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) de los extractos de 8 genotipos diferentes de brócoli, por lo que estimar un valor de actividad antioxidante promedio para un género de *Brassicaceae* es complicado, puesto que no es posible hacer comparaciones entre metodologías. (Podsdek 2007).

Se ha encontrado que la actividad antioxidante depende del método de extracción, y la especie reactiva empleada para la reacción (Azuma et al. 1999; Cao et al. 1996). En el trabajo de Martínez-Sánchez et al. (2008) sobre actividad antioxidante en especies de vegetales del tipo Brassicaceae en el que se encontraron actividades más altas con el método ABTS que con los métodos DPPH y FRAP, aunque se encontraron buenas correlaciones entre los valores de estas tres metodologías. Otro trabajo que evaluó varios métodos de determinación de capacidad antioxidante en vegetales del tipo Brassicaceae (Heimler et al. 2006), encontró que el método por DPPH reflejó satisfactoriamente la jerarquía de los resultados obtenidos mediante diferentes enfoques metodológicos como TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity), FRAP (ferric reducing ability of plasma), y ORAC.

Generalmente, entre los vegetales del tipo *Brassicaceae*, se ha reportado que las coles de Bruselas, el brócoli y el repollo morado, se encuentran entre las especies con mayor capacidad antioxidante (Podsdek 2007), pero hay resultados inconclusos sobre si los tratamientos térmicos incrementan o disminuyen la actividad antioxidante en esta familia de vegetales. En el estudio de Puupponen-Pimia et al. (2003), se observó una disminución del 23% en el índice de DPPH en coliflor luego de la cocción, pero en el caso del repollo se observó un incremento del 9% luego del escaldado en agua. En una evaluación hecha por Zhang y Hamazu (2004), entre la cocción convencional y por microondas, tanto los tallos como la cabeza del brócoli mantuvieron cerca del 35% de su capacidad antioxidante medida por el método de DPPH, de manera similar, según (Lin y Chang 2005), los extractos de brócoli cocido durante 10min a 50°C disminuyó a 31% por efecto de la cocción, en comparación con los extractos crudos que presentaron una actividad antioxidante de 40%. Wu et al. (2004) observó una disminución del 21% en la actividad total ORAC, y que esta actividad era más por compuestos lipofílicos liberados durante la cocción que por los hidrofílicos, pero de manera contraria, el repollo rojo presentó una actividad antioxidante ORAC muy superior (40%) en comparación con las medidas en crudo (Podsdek 2007).

Debido a este hecho, los germinados de vegetales del tipo *Brassicaceae* en general, se presentan como un potencial nuevo alimento funcional, puesto que se consumen generalmente en forma cruda, el proceso de germinación es rápido y económico, y constituye una manera sencilla para incrementar el contenido nutricional de la dieta diaria, incorporándose fácilmente en ensaladas y sándwiches (Pérez-Balibrea et al. 2008).

Debido a que se encontró que el brócoli posee buenas propiedades antioxidantes se evaluaron los germinados para determinar el efecto que los tratamientos con soluciones de microalgas ejercieron sobre los mismos, se empleó la metodología de DPPH y se comparó con la actividad de germinados no tratados con estas soluciones.

2.4.2 B-CAROTENO

Los carotenoides (carotenos y xantofilas) son pigmentos amarillos, naranja y rojos que se encuentran presentes en muchas frutas y vegetales. Muchos de ellos son precursores de vitamina A (como por ejemplo β -caroteno, γ -caroteno y β -criptoxantina) que es de gran importancia para mantener saludable la piel, los huesos y los sistemas gastrointestinales y respiratorios (Kurilich et al. 1999), y debido a los enlaces dobles conjugados también son compuestos con capacidades antioxidantes. Se ha encontrado una correlación entre bajos valores de β -caroteno en sangre y mayores riesgos a sufrir enfermedades cardiovasculares y cáncer, así como un incremento del riesgo a sufrir infartos al miocardio en fumadores (Podsdek 2007).

Los carotenos se encuentran en las fracciones liposolubles de los sistemas biológicos, tales como membranas y lipoproteínas de baja densidad, además protegen las membranas celulares de radicales libres. Se ha determinado que los principales carotenoides en los vegetales de la familia *Brassicaceae* son la luteína y el β -caroteno (Tabla 1).

Se han reportado altas variaciones entre el contenido de vitaminas según la variedad de *Brassicaceae* evaluada de hasta un 79% en β -caroteno y hasta un 55% en ácido ascórbico (Kurilich et al. 1999), pero no se encontraron correlaciones entre el contenido de β -caroteno y ácido ascórbico, lo cual no es de extrañar puesto que estos dos compuestos se encuentran

en fracciones diferentes al ser una liposoluble y la otra hidrosoluble. Kurilich et al. (1999), reporta un promedio de contenido de β -caroteno de 0.89mg/100grPF de un rango de 0.37-2.42mg/100gPF en brócoli, mientras que la USDA – NCC Carotenoid Database for U.S. Foods (1998) reporta un contenido de β -caroteno en brócoli crudo de 779 μ g/100g \pm 194 porción comestible.

En un estudio desarrollado para evaluar el efecto de la temperatura y la radiación sobre el contenido de compuestos antioxidantes en brócoli (Schonfof et al. 2007), se determinó que el contenido de luteína variaba con la temperatura a la que estuvo sometido el cultivo, mientras que el contenido de β -caroteno no sufrió modificaciones por la temperatura ni por el nivel de radiación solar.

No se han encontrado referencias sobre el contenido de β -caroteno en germinados, pero por ser el segundo carotenoide de importancia en el brócoli, se consideró importante evaluar el efecto del cultivo de estos germinados sobre soluciones de microalgas, y su comparación con el contenido en el control, cultivado sin ellas.

Tabla 1 Contenido de carotenoides en vegetales de la familia *Brasicáceas* (mg/100g porción comestible) de acuerdo a estudios realizados por diferentes autores (Podsdek 2007)

| Vegetal | α -caroteno | β -caroteno | Luteína - zeaxantina | Referencias |
|-------------------|--------------------|-------------------|----------------------|--------------------------|
| Brócoli | 0.001 | 0.78 | 2.45 | Holden et al. (1999) |
| | 0 | 0.28 | 0.80 | Muller (1997) |
| | tr | 1.00 | 1.80 | Heinonen et al. (1999) |
| | 0-0.007 | 0.37-2.42 | NA | Kurilich et al. (1999) |
| | NA | 1.24-1.92 | 2.42-3.50 | de Sa et al. (2004) |
| | 0 | 0.55 | 0.78 | Mukovic, Gams, Draxl and |
| | NA | 0.63 | 1.05 | Zhang y Hamauzu (2004) |
| Coles de Bruselas | 0.006 | 0.45 | 1.59 | Holden et al. (1999) |
| | 0.05 | 0.63 | 2.71 | Muller (1997) |
| | - | 0.43 | 0.92 | Heinonen et al. (1999) |
| | 0.001 | 0.77-1.02 | NA | Kurilich et al. (1999) |
| | | | | |

| | | | | |
|--|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| Repollo blanco | 0 | 0.07 | 0.31 | Holden et al. (1999) |
| | 0 | 0.02 | 0.08 | Muller (1997) |
| | tr | 0.07 | 0.15 | Heinonen et al. (1999) |
| | <0.01 | 0.01-0.13 | NA | Kurilich et al. (1999) |
| | 0 | 0.41 | 0.45 | Mukovic et al. (2000) |
| Repollo morado | 0 | 0.05 | 0.15 | Muller (1997) |
| | tr | 0.02 | 0.03 | Heinonen et al. (1999) |
| | | | | |
| Col rizada | 0 | 9.23 | 39.55 | Holden et al. (1999) |
| | 0.15 | 7.28 | 18.63 | Muller (1997) |
| | 0.05-0.07 | 3.65-6.08 | NA | Kurilich et al. (1999) |
| | NA | 2.84-4.38 | 3.04-5.26 | de Sa et al. (2004) |
| Coliflor | 0 | <0.01 | 0.02 | Muller (1997) |
| | - | 0.01 | 0.03 | Heinonen et al. (1999) |
| | ND | 0.07-0.08 | NA | Kurilich et al. (1999) |
| ND – Por debajo del nivel de detección; NA – no analizado | | | | |

2.4.3 ÁCIDO ASCÓRBICO

Las dietas ricas en frutas y vegetales se han asociado con la disminución del riesgo de algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares, atribuyéndose este efecto en parte a altas concentraciones de antioxidantes en dichas materias. El ácido ascórbico, es el antioxidante hidrosoluble más abundante encontrado en plantas (Tabla 2), es también un nutriente esencial para humanos y otros animales. Junto con los flavonoides, polifenoles, y compuestos lipofílicos como la vitamina E, contribuye con la cantidad total de metabolitos antioxidantes de la dieta humana (Hancock y Viola 2005).

Tabla 2 Valores promedio, desviación estándar, y máximos y mínimos de compuestos de interés en brócoli expresados en mg/100g peso fresco (Schonfof et al. 2007)

| | Promedio | Desviación estándar | Mínimo | Máximo |
|------------------------|----------|---------------------|--------|--------|
| Ácido ascórbico | 96.79 | 9.97 | 80.91 | 119.94 |
| Beta Caroteno | 0.35 | 0.15 | 0.05 | 0.77 |
| Luteína | 0.41 | 0.14 | 0.17 | 0.79 |

| | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|------|-------|
| Clorofila a | 5.00 | 1.12 | 3.31 | 8.74 |
| Clorofila b | 1.95 | 0.43 | 1.22 | 3.34 |
| Total de glucosinolados | 24.35 | 11.62 | 6.33 | 47.26 |
| Alquenil glucosinolados | 0.83 | 0.23 | 0.31 | 1.36 |
| Progoitrina | 0.48 | 0.14 | 0.25 | 0.82 |
| Gluconapoleiferina | 0.35 | 0.12 | 0.02 | 0.55 |
| Alquil glucosinolados | 13.47 | 11.68 | 2.08 | 39.04 |
| Glucoiberina | 1.60 | 1.07 | 0.31 | 3.88 |
| Glucorafanina | 11.87 | 10.62 | 1.77 | 35.16 |
| Indol Glusosinolados | 10.05 | 4.46 | 2.84 | 19.91 |
| Glucobrasicina | 8.06 | 3.72 | 2.30 | 16.08 |
| 4-Metoxiglucobrasicina | 0.51 | 0.22 | 0.10 | 0.93 |
| 4-Hidroxiglucobrasicina | 0.07 | 0.07 | 0.00 | 0.35 |
| Neoglucobrasicina | 1.41 | 0.82 | 0.40 | 3.00 |

La vitamina C fue aislada por primera vez en 1928, y su estructura fue establecida en 1933, denominándose este compuesto como ácido L-ascórbico en reconocimiento a su papel en la protección contra el escorbuto. El principal atributo del ácido ascórbico, es su capacidad reductora a pH 7. Es un antioxidante muy efectivo, dada su capacidad de donar electrones y por la baja reactividad de sus productos de oxidación. Se ha relacionado como facilitador de la absorción de hierro en el organismo, y facilita la acción de enzimas en las plantas en el catabolismo de compuestos glucosinolados (Hancock y Viola 2005).

La vitamina C, que incluye el ácido ascórbico y su producto de oxidación, tiene muchas actividades biológicas en el cuerpo humano. Se puede definir la función biológica del ácido ascórbico como un cofactor enzimático, un aceptor/donador de electrones en la membrana plasmática, y puede regenerar el α -tocoferol (Podsdek 2007).

Estos estudios sobre la función del ácido ascórbico en el organismo humano, forman parte de la fuerza motriz que impulsa nuevos esfuerzos para desarrollar variedades de cultivos con contenidos nutricionales mejorados. La vitamina C, es claramente uno de los compuestos objetivo, y aunque la fortificación de alimentos vía medios sintéticos es técnicamente viable, es una operación costosa y los consumidores empiezan a presentar resistencia a este tipo de enriquecimiento de los alimentos, aunado a mayores restricciones

en las legislaciones sobre el tipo y niveles de fortificación de alimentos y bebidas permitidos, por lo que las plantas se convierten en las mayores fuentes de ingesta de vitamina C claramente reconocidos por los consumidores (Hancock y Viola 2005).

En lo que respecta a los vegetales del tipo Crucíferas, son considerados como buenas fuentes de ácido ascórbico, con contenidos de hasta 100 mg/100 g en peso fresco, al igual que en guisantes y en pimientos (Hancock y Viola 2005), pero el contenido de vitamina C en vegetales del tipo crucífera, puede variar significativamente entre sus subespecies (Tabla 3), atribuyéndose estas diferencias a su genotipo (Kurilich et al. 1999), a las condiciones climáticas, y a las de fertilización de los suelos cultivados.

El ácido ascórbico, es un antioxidante que ejerce efectos fotoprotectores y confiere resistencia a factores ambientales, por lo que muchos trabajos de investigación han asociado su incremento con factores de estrés por radiación. Se encontró que la temperatura ejerce una fuerte influencia sobre el contenido de ácido ascórbico en brócoli. En el estudio realizado por Schonfof et al. 2007, se observó que el incremento de la temperatura en un rango de 15-20°C produjo una disminución de hasta un 38% en comparación con el brócoli cultivado en el rango de temperatura de 7-12°C. Sumado a las bajas temperaturas, el efecto de una radiación moderada ($>5.5 \text{ mol.m}^{-2}.\text{día}^{-1}$), produjo también una mayor acumulación de ácido ascórbico.

Tabla 3 Contenido de ácido ascórbico en vegetales del tipo crucíferas tomado de (Podsdek 2007) expresado en mg/100g porción comestible.

| Vegetal | Contenido ácido ascórbico | Referencias |
|---------|---------------------------|------------------------|
| Brócoli | 34-93 | Favell (1998) |
| | 41-64 | Franke et al. (2004) |
| | 74.8 | Bahorun et al. (2004) |
| | 75 | Hussein et al. (2000) |
| | 84 | HrciricK et al. (2001) |
| | 93 | Chu et al. (2002) |
| | 103 | Zhang & Hamauzu (2004) |
| | 112 | Murcia et al. (2000) |
| | 113 | Davey et al. (2000) |
| | 54-120 | Kurilich et al. (1999) |
| | 43-146 | Vallejo et al. (2002) |
| | | |

| | | |
|--------------------------|--------|--|
| Coles de Bruselas | 76 | Pfendt, Vukasinovic, Blagojevic and Radojevic (2003) |
| | 87-109 | Davey et al. (2000) |
| | 192 | Czarniecka-Skubina (2002) |
| | | |
| Repollo blanco | 18.8 | Bahorun et al. (2004) |
| | 25.6 | Gokmen et al. (2000) |
| | 28.2 | Pfendt et al. (2003) |
| | 23-33 | Kurilich et al. (1999) |
| | 32 | Chu et al. (2002) |
| | 43 | Puupponen-Pimia et al. (2003) |
| | 44 | Hrncirik et al. (2001) |
| | 46-47 | Davey et al. (2000) |
| | | |
| Col rizada | 92.6 | Pfendt et al. (2003) |
| | 186 | Davey et al. (2000) |
| | | |
| Coliflor | 17.2 | Pfendt et al. (2003) |
| | 40-44 | Kurilich et al. (1999) |
| | 49.9 | Bahorun et al. (2004) |
| | 64 | Hrncirik et al. (2001) |
| | 64-78 | Davey et al. (2000) |
| | 81 | Puupponen-Pimia et al. (2003) |

Lisiewska y Kmiecik (1996) reportaron que la fertilización con nitrógeno no afectó el contenido de vitamina C en brócoli, pero que el incremento de 80 a 120Kg.ha⁻¹ disminuyó el contenido de este compuesto en un 7% en coliflor.

2.4.4 GLUCOSINOLADOS Y SULFORAFANE

El brócoli, el repollo, el coliflor, y las coles de Bruselas son las especies de crucíferas más consumidas en la dieta humana, y se ha demostrado que son ricas en compuestos glucosinolados (Liang et al. 2006).

Cuando se cortan o muelen este tipo de vegetales, la enzima mirosinasa (tioglucosido glucohidrolasa (EC 3.2.3.1) y los glucosinolados, entran en contacto. La mirosinasa (Figura 1), rompe el enlace β -tioglucosido de las moléculas de glucosinolados produciendo glucosa, sulfato y un grupo diverso de productos de agliconos. Los agliconos resultantes sufren transformaciones no enzimáticas y rearrreglos intramoleculares para producir isotiocianatos,

tiocianatos o nitrilos (Liang et al. 2005). La glucorafanina (4-metilsulfinibutil glucosinolado), es un glucosinolado que se encuentra en el brócoli y el repollo, cuando es hidrolizado por la mirosinasa, produciendo principalmente sulforafane (4-metilsulfinibutil isotiocianato) (Figura 2), y nitrilo de sulforafane (5-metilsultinipentano nitrilo), (Liang et al. 2006).

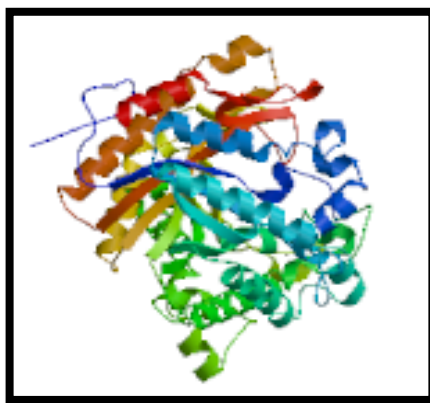


Figura 1 Estructura de la enzima mirosinasa EC 3.2.3.1 tomado de:
<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/date/2myr.html>

La conversión del glucosinolato glucorafanina a sulforafane mediante acción de la mirosinasa y el metabolismo de sulforafane a su ácido mercaptánico conjugado fue reportado por Keck et al. (2003). El sulforafane pertenece a un grupo de moléculas bioactivas denominadas isotiocianatos. Su fórmula molecular es $C_6H_{11}NOS_2$, y su peso molecular es 177.29. También se conoce como 4-metilsulfinilbutil isotiocianato y como (-)-1-isotioacianato-4(R)-(metilsulfinil)butano (Sivakumar et al. 2007)

El isotiocianato sulforafane ha atraído mucha atención recientemente desde que se descubrió que es el inductor natural de enzimas de desintoxicación de fase-II más potente, y se ha encontrado que reduce la incidencia de un gran número de formas de tumores. Aun en cantidades de dosis dietéticas, el sulforafane puede modular los sistemas metabólicos enzimáticos xenobióticos, modificando el balance del metabolismo carcinogénico hacia la desactivación del mismo (Liang et al. 2006). Algunos investigadores han concluido que la evidencia de beneficios para la salud por el sulforafane, es lo suficientemente fuerte como para justificar el desarrollo de productos (Moreno et al. 2006). Se ha reportado el desarrollo

comercial de un producto patentado (BroccoSprouts®) que consiste en germinados de brócoli con un alto y uniforme contenido de sulforafane, desarrollado por un grupo de investigadores de Johns Hopkins University School of Medicine (www.brassica.com).

El sulforafane, obtenido por síntesis química, requiere la utilización de sustancias muy tóxicas, y tiene la desventaja que los productos finales de estas reacciones aun contienen residuos tóxicos requiriendo purificaciones adicionales. Esta desventaja limita el uso de sulforafane sintético como aditivo en alimentos (Liang et al. 2005).

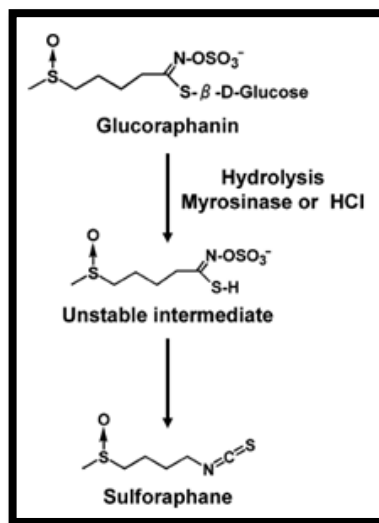


Figura 2 Proceso de degradación de la Glucorafanina para producir Sulforafane (Nakagawa et al. 2006)

Liang et al (2006), reporta el contenido de 18 variedades diferentes de brócoli y repollo (Tabla 4), donde el contenido de sulforafane mas alto encontrado por ellos fue en la variedad ZhQNo.26 (32.9 $\mu\text{g/g}$ PF) y el contenido más bajo fue en la variedad ZhQNo.172 (1.4 $\mu\text{g/g}$ PF). Se encontraron de igual manera, diferencias significativas entre las partes del brócoli, el contenido más alto fue en las floescencias (cabeza), y la más baja en las hojas (Tabla 5). El contenido promedio fue el doble en la cabeza que en los tallos y diez veces mayor que en las hojas, pero en los germinados fue donde se encontró la más alta concentración, luego de en las semillas.

Tabla 4 Contenido de sulforafane en 18 especies de brócoli y repollo (Liang et al., 2006)

| Brócoli | | Repollo | |
|-------------|-----------------------------------|------------|-----------------------------------|
| Variedad | Contenido ($\mu\text{g/g}$, PF) | Variedad | Contenido ($\mu\text{g/g}$, PF) |
| ZhQ no. 9 | 19.2 \pm 1.8 | CA no. 6 | 3.2 \pm 1.2 |
| ZhQ no. 16 | 17.6 \pm 2.0 | CA no. 48 | 5.3 \pm 1.8 |
| ZhQ no. 18 | 14.4 \pm 0.6 | CA no. 49 | 1.8 \pm 0.2 |
| ZhQ no. 20 | 22.1 \pm 2.3 | CA no. 100 | 4.5 \pm 0.4 |
| ZhQ no. 26 | 32.9 \pm 1.5 | CA no. 105 | 4.7 \pm 0.5 |
| ZhQ no. 27 | 6.0 \pm 0.8 | CA no. 152 | 4.3 \pm 0.8 |
| ZhQ no. 28 | 9.2 \pm 1.2 | CA no. 163 | 2.9 \pm 0.3 |
| ZhQ no. 145 | 5.4 \pm 0.4 | CA no. 174 | 1.2 \pm 0.4 |
| ZhQ no. 159 | 20.4 \pm 3.2 | CA no. 185 | 4.7 \pm 1.2 |
| ZhQ no. 163 | 8.4 \pm 1.4 | CA no. 194 | 2.5 \pm 0.2 |
| ZhQ no. 166 | 11.5 \pm 1.5 | CA no. 197 | 2.1 \pm 0.2 |
| ZhQ no. 168 | 12.1 \pm 0.9 | CA no. 203 | 2.2 \pm 0.5 |
| ZhQ no. 172 | 1.4 \pm 0.1 | CA no. 205 | 4.3 \pm 0.3 |
| ZhQ no. 175 | 18.6 \pm 1.5 | CA no. 213 | 3.3 \pm 0.5 |
| ZhQ no. 176 | 23.2 \pm 1.6 | CA no. 217 | 0.7 \pm 0.0 |
| ZhQ no. 180 | 17.0 \pm 2.1 | CA no. 227 | 0.7 \pm 0.1 |
| ZhQ no. 187 | 2.3 \pm 0.4 | CA no. 316 | 2.5 \pm 0.2 |
| ZhQ no. 188 | 20.5 \pm 1.8 | CA no. 318 | 2.7 \pm 0.1 |
| Mean | 14.6 | Mean | 3.0 |

^a Los valores representan el promedio \pm desviación estándar, n=3.

Existen varios métodos para determinar el contenido de sulforafane, como cromatografía líquida (HPLC), cromatografía de gases (GC), y espectrometría de gases acopladas a masas (GC/MS), pero se encontró reportado que el sulforafane sufre degradación por altas temperaturas en el sistema de inyección de GC/MS, y que la mayoría de los métodos encontrados para cuantificar dicho compuesto son muy elaborados y consumen mucho tiempo impidiendo evaluar grandes cantidades de muestras. Liang et al (2006), desarrollaron una metodología rápida, simple y precisa para analizar el contenido de sulforafane de brócoli y repollo que fue la empleada en este proyecto.

Tabla 5 Concentración de sulforafane en muestras de brócoli comercial (Nakagawa et al. 2006)

| Muestra | Parte o Forma | Concentración de Sulforafane ^a (mg/100 g Peso Seco) |
|--|---------------|--|
| brócoli maduro A | flor | 171.3 ± 4.7 |
| | tallo | 89.3 ± 2.8 |
| brócoli maduro B | flor | 69.1 ± 4.5 |
| | tallo | 44.3 ± 0.3 |
| germinado de brócoli | entero | 1153.0 ± 32.7 |
| brócoli producto A | tableta | <1 |
| brócoli producto B | polvo | <1 |
| brócoli producto C | tableta | 20.1 ± 3.2 |
| brócoli producto D | polvo | <1 |
| brócoli producto E | tableta | <1 |
| brócoli producto F | tableta | <1 |
| brócoli producto G | tableta | <1 |
| ^a Los valores representan el promedio ± desviación estándar, n=3. | | |

La actividad anticarcinogénica del sulforafane, ha llevado a varios estudios sobre factores genéticos y ambientales que determinan la acumulación de su precursor, glucorafanina, en brócoli (Farnham et al. 2004; Jeffery et al. 2003). Estos estudios se han concentrado en variedades existentes de brócoli, y en cruces entre ellos para desarrollar variedades que puedan suministrar niveles más altos de estos isotiocianatos anticancerígenos. Según Sarikamis et al. (2006), otros estudios se han concentrado en desarrollar nuevas variedades de brócoli, mediante la introducción de cruces con variedades silvestres como *B. villosa* con brócoli comercial, así como aquellos que se han enfocado en desarrollar híbridos de brócoli con características aptas para consumo humano y analizar su contenido de fitoquímicos y la correspondiente bioactividad que presentan estas nuevas variedades.

Muchos estudios se han dedicado a evaluar el contenido de glucorafanina en brócoli y otros vegetales de la familia Brassicaceae, pero existen dos productos de la hidrólisis de esta molécula, el sulforafane que es nuestra molécula de interés por sus propiedades anticarcinogénicas, y el sulforafane nitrilo, cuya actividad quimoprotectora es muy reducida

en comparación con el sulforafane (Matusheski y Jeffery 2001). La diferencia en actividad entre estas dos moléculas implica, que sin un mecanismo que regule la conversión preferencial de la glucorafanina a sulforafane en vez de hacia la formación de sulforafane nitrilo, el contenido de este glucosinolado no es la medida más adecuada sobre la potencial actividad anticancerígena que puede aportar el brócoli o sus germinados. Pero dado que su contenido se puede relacionar con la máxima cantidad de sulforafane que se podría obtener, su análisis y por ende su contenido es relevante.

La concentración de glucorafanina en brócoli (*B. oleracea var. itálica*) disminuyó desde el inicio de la germinación hasta las etapas de florecimiento. Encontraron que la menor concentración se encontró al iniciarse la etapa de florecimiento, y que entre los diferentes tejidos de la planta, la mayor concentración se halló en la inflorescencia (Tabla 6). La mayor concentración de glucorafanina se encontró en las semillas de brócoli sin germinar, seguida por los germinados (Rangkadilok et al. 2002), Liang et al. (2005), también encontraron que la mayor concentración de sulforafane se encuentra en las semillas de brócoli (Tabla 7).

Tabla 6 Concentración de glucorafanina ($\mu\text{mol/g PS}$) en diferentes etapas de crecimiento de dos genotipos de *B. oleracea var. Itálica* (brócoli) (tomado de Rangkadilok et al., 2002)

| Genotipo | Etapas 1 Semilla (0 días) | Etapas 2 (7 días) | Etapas 3 Primera hoja real (20 días) | Etapas 4 Vegetal (50 días) | Etapas 5 Cabeza verde (180 días) | Etapas 6 Florecimiento (195 días) | Test final | LSD ($P=0.05$, d.f.=12) |
|--|---------------------------------|-------------------------|---|----------------------------------|---|---|---------------|---------------------------------|
| BR-432 | 434.88aA | 120.9bA | 45.3cA | 5.6dA | 1.8dA | 0.3dA | ... | 21.1 |
| Monaro | 67.2aB | 22.4bB | 18.5bcB | 2.3cdA | 1.9cdA | 0.8dA | ... | 17.3 |
| | F-test | LSD (0.05) (d.f.=22) | | | | | | |
| Genotipo | ... | 7.6 | | | | | | |
| Etapas de Crecimiento | ... | 13.2 | | | | | | |
| Interacción | ... | 18.7 | | | | | | |
| ^a Letras pequeñas (a-d) comparación de promedios entre etapas de crecimiento en una fila (del mismo genotipo). Letras mayúsculas (A y B) comparación de promedios entre los genotipos en cada etapa de crecimiento a niveles del 5% según resultados del ANOVA. *** $P<0.001$. | | | | | | | | |

Tabla 7 Contenido de sulforafane en algunas semillas de especies de crucíferas (Liang et al., 2005)

| Contenido de sulforafane en semillas de <i>B. oleracea</i> | | | |
|--|---------------|--|-------------------|
| Grupo | Varietad | Contenido de Sulforafane ($\mu\text{g/g}$) | |
| Brócoli | Zhongqing II | 4748 ^a | 2841 ^b |
| | Greenshirt | 4548 | |
| | Greenyu | 2036 | |
| | Broccoli 70 | 1619 | |
| | Greenball | 1349 | |
| | Greenwave | 2746 | |
| Coles de Bruselas (germinados) | Brussels 08 | 201 | 162 |
| | Brussels 09 | 123 | |
| Col | CA 03 | 161 | 261 |
| | CA 05 | 350 | |
| | CA 08 | 272 | |
| | CA 09 | 261 | |
| Coliflor | Snowflower 01 | 75.6 | 62.5 |
| | Snowflower 02 | 49.4 | |
| Col rizada | K11 | 499 | 340 |
| | K15 | 181 | |
| ^a Los valores representan el promedio de tres repeticiones por variedad | | | |
| ^b Los valores representan el promedio. Promedios calculados a partir de las siguientes variedades: brócoli 6, Coles | | | |

El contenido de glucosinolados puede ser significativamente afectado tanto como por la fertilización con azufre como con nitrógeno (Kim et al. 2001). Zhao et al. (1994) reportaron que la aplicación abundante de nitrógeno, incrementó el contenido de progoitina en *Brassicaceae napus*, mientras que disminuyó el contenido de sinigrina. Otros reportes también indican que la fertilización con azufre puede afectar el nivel de glucosinolados más que la fertilización con nitrógeno (Rosa et al. 1996). Sin embargo, en suelos deficientes en azufre, la fertilización con éste compuesto incrementó hasta tres veces el contenido de glucosinolados en canola mientras que la fertilización con nitrógeno la disminuyó. En general se ha observado una reducción del 40% en glucosinolados en plantas cultivadas en regímenes con baja fertilización de azufre de suelos livianos, con respecto a suelo pesados (Ciska et al. 2000). También se ha reportado que la fertilización con azufre tiene efecto

negativo sobre el nivel de glucosinolados alifáticos en germinados de brócoli, pero el efecto contrario en glucosinolados indólicos y aromáticos (De Pascale et al. 2007).

Otro trabajo (Aires et al. 2006), concluye que los germinados de brócoli no se benefician de los procesos de fertilización. Evaluaron la fertilización de germinados de brócoli con fuentes convencionales de nitrógeno y azufre encontrando un efecto negativo sobre el contenido de glucosinolados totales en los germinados, disminuyendo el contenido de los mismos respecto al contenido de los germinados control sin fertilizar. Dicha investigación señala que la producción u acumulación de compuestos glucosinolados en los germinados de brócoli es muy sensible a la concentración de sales en las soluciones sobre las que se hacen crecer, y que aún en concentraciones de 0.62g.L^{-1} se produce la disminución de glucosinolados tanto en las hojas como en las raíces del germinado.

El contenido de los alquil glucosinolatos glucoiberina y glucorafanina se vieron influenciados por la temperatura y por la radiación. Ambos contenidos se incrementaron con la disminución de temperatura y el incremento de la radiación. Existe una fuerte correlación entre la temperatura, la radiación y el contenido total de alquil glucosinolados (Schonfof et al. 2007). Reportan de igual manera que el brócoli cultivado bajo temperaturas de 12°C combinados con un incremento en la radiación producía altos contenidos de alquil glucosinolados. Otros estudios, muestran diferencias significativas en el contenido de glucosinolados entre las estaciones a las que se cultiva el brócoli (Ciska et al. 2000; Rosa et al. 1996; Schonfof et al. 2007). Estos cambios de concentraciones se han atribuido a la exposición de condiciones de estrés referidos a factores abióticos y bióticos, como agua, temperatura, radiación, suministro de nitrógeno y daño por pestes. Valente Pereira et al. (2002) detectaron niveles más altos de glucosinolados individuales cuando las plantas y los germinados de brócoli se hicieron crecer en condiciones supra-óptimas induciendo mayores niveles de glucosinolados.

De igual manera, el ácido ascórbico que también es dependiente de la temperatura, modula fuertemente la actividad hidrolizante de la enzima mirosinasa (Burmeister et al. 2000). Los glucosinolados y el ácido ascórbico se encuentran en las vacuolas de la misma célula,

mientras que la mirosinasa se encuentra principalmente ubicada en células idioblásticas mirosínicas (Bones y Rossiter 1996). La mirosinasa es fuertemente activada por una concentración 0.5mM pudiendo hidrolizar glucosinolados en extractos crudos de brócoli (Li y Kushad 2005)

En otro estudio presentado por Sivakumar et al. (2007), germinados de 9 días post germinación, presentaron contenidos significativamente inferiores a los de los germinados de 3 días post germinación (Tabla 8). Hasta la fecha, no se han encontrado reportes que indiquen una razón por la cual existe una mayor acumulación de sulforafane en germinados y plántulas jóvenes, y su disminución durante el crecimiento. Este efecto también fue observado por otros investigadores (Jeffery et al. 2003; Nakagawa et al. 2006; Valente Pereira et al. 2002), quienes verifican esta tendencia en esta familia de vegetales. Es posible, que los germinados y las plántulas jóvenes estén sometidas a mayor estrés, o que los genes asociados se expresen de manera más fuerte en esta época temprana, y por lo tanto desarrollan mayores niveles de sulforafane (Sivakumar et al. 2007).

Tabla 8 Contenido de sulforafane en especies europeas de *Brassicaceae* y su variabilidad con el crecimiento de la plántula (Tomado de Sivakumar et al., 2007)

| Variedad <i>Brassica</i> | Contenido de Sulforafane (mg/g p.s.) | |
|--|--------------------------------------|------------------|
| | 3-día-germinado | 9- día-germinado |
| <i>Brassica oleracea</i> L. | | |
| Coliflor Alverda (var. botrytis) | 0.92 g ^A | 0.14 f |
| Coliflor di Jesi (var. botrytis) | 0.81 g | 0.54 e |
| Coliflor minaret (var. botrytis) | 1.20 f | 0.66 e |
| Brócoli Ramoso Calabrese (var. botrytis) | 1.74 b | 1.60 a |
| Col blanca (var. capitata) | 1.67 c | 0.84 d |
| Palm cabbage Cuor di Bue (acephala) | 1.71 b | 1.11 c |
| Brócoli primor (var. Itálica) | 1.82 b | 1.31 b |
| Col rizada riccio dÁsti (var. Sabauda) | 1.35 e | 0.85 d |
| Brócoli eolo (var.botrytis) | 0.87 g | 0.24 f |
| Delicato | 1.32 e | 0.79 d |
| Coliflor nuvola (var.botrytis) | 0.91 g | 0.17 f |
| Coliflor palla di neve | 1.50 d | 0.93 c |
| San martino | 2.21 a | 1.53 a |

| | | |
|---|--------|--------|
| Velox | 1.39 e | 0.76 d |
| | | |
| Brassica rapa L. | | |
| Turnip Senza Testa | 0.93 g | 0.61 e |
| Cima di rapa 40 | 1.15 f | 0.92 c |
| Cima di rapa 90 | 1.62 c | 1.22 b |
| Cima di rapa 120 | 1.05 f | 1.01 c |
| ^A Promedio de separación entre columnas por la prueba de rango múltiple de Duncan, | | |

2.5 EFECTO DE LA FERTILIZACIÓN Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE EL CONTENIDO DE NUTRIENTES EN VEGETALES Y HORTALIZAS

La fertilización es un factor importante y limitante para el crecimiento y productividad de los cultivos agrícolas, debido a que la mayoría de las plantas remueven grandes cantidades de nutrientes del suelo. Pero, la fertilización química indiscriminada ha producido consecuencias graves en los suelos cultivados de manera extensiva, sobre todo, en los monocultivos, por la degradación de la estructura y el perfil nutricional de los mismos. Adicionalmente, se ha reportado la pérdida de nutrientes en los productos vegetales debió al énfasis de los cultivos modernos hacia una mayor productividad (Burns 2010).

Como alternativa a los fertilizantes comerciales se han desarrollado una serie de técnicas de bio-fertilización como el uso de compostaje vegetal, fertilizantes orgánicos, y fertilizaciones biológicas, con el fin de promover prácticas agrícolas sostenibles, amigables al ambiente, y promover cultivos nutricionalmente más densos o puesto de otra manera, con mayor contenido de compuestos fitoquímicos de interés.

Entre los nutrientes de interés, el nitrógeno es uno de los principales compuestos para favorecer el crecimiento de las plantas, por ello, la importancia de la presencia en el suelo de bacterias fijadoras de nitrógeno (Abd el Moniem et al. 2008). Las técnicas de bio-fertilización empleando extractos de microalgas, se presentan como alternativas potenciales

dados sus contenidos de micro y macro nutrientes, y otros compuestos de interés para el desarrollo de cultivos, como aminoácidos y sustancias promotoras de crecimiento (Stirk et al. 2002).

El efecto de las técnicas de fertilización sobre la concentración de fitoquímicos o compuestos funcionales en vegetales y frutas no ha sido extensamente estudiado, pero se ha determinado que la síntesis y degradación de algunos compuestos son afectadas por la composición de los suelos. Lamentablemente, una gran parte de los suelos productivos del mundo, está sufriendo pérdidas de fertilidad debido a procesos erosivos, pérdida de nutrientes, acumulación de sales y elementos tóxicos, así como desbalances en la compensación de nutrientes. En su mayoría, se deben a las fuertes aplicaciones químicas de fertilizantes, plaguicidas y herbicidas, comunes en la agricultura intensiva moderna, que ha producido además consecuencias graves al ambiente, a la agricultura y a la salud (Faheed y Abd-El Fattah 2008), por ello, se han comenzado a realizar estudios sobre fuentes alternativas de nutrición para los cultivos, como desperdicios orgánicos y biofertilizantes, quienes emergen como una alternativa promisorio para un manejo integrado agrícola y ambiental.

En el trabajo de Meyer y Adam (2008), se reportó el perfil de compuestos glucosinolados en brócoli y repollo comercialmente disponible en Alemania, según su tipo de producción: convencional o ecológica durante un periodo de 12 meses, encontraron diferencias significativas a favor de los productos ecológicos, en el contenido de los indol-glucosinolados glucobrasicina y neo-glucobrasicina en brócoli, y de glucobrasicina en repollo, en los glucosinolados alifáticos (glucorafanina y sinigrina), no se observaron diferencias significativas entre productos de origen convencional o ecológico. Algunos estudios realizados sobre tomates, reportaron resultados contradictorios en lo que se refiere a fertilizaciones orgánicas, con algunos autores señalando que se observan modificaciones en el contenido de compuestos fenólicos y otros que indicaron que no se observaron diferencias (Martínez-Ballesta et al. 2008). Pero las diferencias en los resultados pueden producirse por varios factores, como la variedad vegetal, la madurez al momento de la cosecha, las condiciones climáticas de la región, el estado de los suelos o sustratos, y las

condiciones de almacenamiento post-cosecha de los vegetales (Nautiy et al. 2008), así como de otras variaciones más sutiles, como la época del año en que se realice la cosecha, e incluso variaciones en los métodos de estimación empleados (Singh et al. 2007).

Esta alta variabilidad en la producción de compuestos funcionales en vegetales, han impulsado la necesidad de desarrollar estudios sobre las variedades locales, o disponibles localmente. Como muestra de este tipo de investigaciones se puede mencionar el desarrollado por Singh et al. (2007), sobre la variabilidad de los contenidos de carotenos, fenólicos y las vitaminas C y E en especies vegetales del tipo *Brassicaceae* en India, encontrando que para el caso del brócoli, la evaluación de seis especies diferentes muestra una variación del contenido de vitamina C desde 25.5 hasta 82.3mg/100g PF. El contenido de β -caroteno y Luteína, varía desde 0.48 hasta 1.13mg/100g PF y de 0.41 hasta 1.02mg/100g PF, respectivamente. El contenido de vitamina E en los cultivos de brócoli estuvieron en el rango de 0.22 a 0.68mg/100gPF y los de fenólicos, entre 44.5 y 82.9mg/100g PF, demostrando la variabilidad que puede generarse a causa del genotipo del vegetal.

Según el método de producción, convencional u ecológico, se ha reportado el contenido de glucosinolados según la época del año en que se realiza la cosecha del producto, en el estudio de Meyer y Adam (2008), el contenido de glucorafanina de ambos tipos de cultivo no presentaron diferencias significativas en los primeros seis meses del estudio, pero se incrementó para el cultivo de tipo ecológico (Meyer y Adam 2008), en los siguientes seis meses de manera significativa. Para el contenido de glucobrasicina, se reportó que en algunos meses pero no todos, el contenido del fitoquímico en los productos ecológicos era ligeramente superior al convencional, y para el compuesto neo-glucobrasicina, de los meses de diciembre a marzo se observó un ligero incremento en las muestras de origen ecológico. Este reporte también señaló que los datos de contenidos fitoquímicos de los cultivos ecológicos, presentaron una mayor dispersión, debida probablemente a la baja estandarización en estas prácticas de cultivo.

Los fertilizantes microbiológicos constituyen una práctica agrícola ambientalmente amigable y que comienza a ganar popularidad entre los productores. Los biofertilizantes, incluyen microorganismos capaces de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, y además, contienen promotores de crecimiento. Entre los biofertilizantes más conocidos, se encuentran *Azotobacter*, *Azospirillum*, algas verde-azules, *Azolla*, Micorrizas, y *Sinorhizobium*. El compostaje verde, también contribuye a estimular el crecimiento y la productividad de los cultivos. Las algas secas, contienen un alto contenido de macronutrientes, micronutrientes y aminoácidos. Además se pueden producir de manera económica, y tienen la posibilidad de sustituir parcialmente a los fertilizantes comerciales, así como evitar la contaminación ambiental (Faheed y Abd-El Fattah 2008).

2.5.1 FERTILIZACIÓN CON MICROORGANISMOS

En los últimos años, se ha comenzado a publicar estudios que relacionan varias técnicas de fertilización no convencionales con la productividad de cultivos, así como con la presencia y concentración de compuestos bioactivos en frutas y vegetales. Tal es el caso de un estudio por Nautiy et al. (2008), quienes describen, según ellos por primera vez, el uso potencial de la rizobacteria NRRL B-30488 como promotor de antioxidantes en cinco especies vegetales de alto consumo. El uso de cianobacterias es ampliamente conocido por sus aplicaciones como fijadores de nitrógeno en cultivos de arroz, pero sus aplicaciones, se ven algo mermadas por la posibilidad de producir compuestos tóxicos en algunas variedades. Caso contrario de las microalgas del género *chlorophyta*, quienes no presentan este inconveniente, pero que además ofrecen posibilidades interesantes, tanto por su facilidad y velocidad de crecimiento, como por su contenido de micro y macro nutrientes (Tabla 9 y Tabla 10), la producción de polisacáridos y de algunas fitohormonas (Stirk et al. 2002), quienes pudiesen favorecer la recuperación de suelos, mejorar el contenido de nutrientes y el crecimiento de las plantas.

Tabla 9 Composición aproximada de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* empleadas en los tratamientos aplicados a los germinados de brócoli, expresados como %N de peso seco.

| <i>Especies</i> | Proteína | Carbohidratos | Lípidos |
|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>Spirulina platensis</i> | 63 (a) 61.32 – 64.43 (b) | 15 (a) 15.09 – 15.81 (b) | 11 (a) 7.09 – 8.03 (b) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | 51 – 58 (a) 47.82 (b) | 12 – 17 (a) 8.08 (b) | 14 – 22 (a) 13.32 (b) |

Valores expresados como % peso seco. (a) Becker 2007, (b) Tokusoglu y Ünal 2003.

2.5.2 LAS MICROALGAS COMO ALTERNATIVA PARA LA FERTILIZACIÓN DE CULTIVOS

Las microalgas son unos de los organismos más antiguos en existencia, se han adaptado a ambientes extremos y han evolucionado durante billones de años (Raja et al. 2008). Se ha estimado que existen entre 22.000 y 26.000 especies, de las cuales solamente unas muy pocas se utilizan con fines comerciales, entre ellas, *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Porphiridium*, *Scenedesmus*, *Nitzschia*, *Isochrysis*, *Schyzochytrium*, *Phaeodactylum*, y otras.

Las algas verde-azules se han convertido en biofertilizantes populares para el cultivo de arroz y para la fijación de nitrógeno, específicamente con *Anabaena* y *Nostoc*. Se ha encontrado que las algas verde-azules pueden reducir el uso de fertilizantes químicos hasta en un 15%, y pueden contribuir a la fijación de unos 20-30Kg de nitrógeno biológicamente fijado por hectárea, por temporada de cultivo (Raja et al. 2008).

Chlorella (Figura 3), es una alga no motil unicelular esférica, de 2-10µm de diámetro. Se conoce por su potencialidad como alimento dado su contenido en proteína y otros nutrientes, en forma seca, contiene alrededor de un 45% de proteína, 20% lípidos, 20% carbohidratos y 10% entre varios minerales y vitaminas (Raja et al. 2008). Se ha reportado el uso de extractos de células de *Chlorella vulgaris*, y sus efectos sobre algunos cultivos de frutos de bananos, observándose una ligera mejora en la calidad y productividad de los mismos (Abd el Moniem et al. 2008); sobre el crecimiento vegetativo, productividad y

calidad de viñedos (Abd el Moniem y Abd-Allah 2008), y su efecto como biofertilizante sobre parámetros de crecimiento y aspectos metabólicos de la planta de lechuga (Faheed y Abd-El Fattah 2008).

Scenedesmus (Figura 3), es una microalga verde, no motil, que se pueden encontrar en forma unicelular, o formando colonias de entre 2 y 4 células. Pueden tener forma cilíndrica, pero generalmente son ovoideas terminando en punta en los extremos. Generalmente es empleada en tratamientos de aguas, puesto que ayuda a degradar materia orgánica, tiene propiedades bactericidas, y es productora de polisacáridos exógenos, que se han evaluado por su posibilidad en estructuración de suelos.

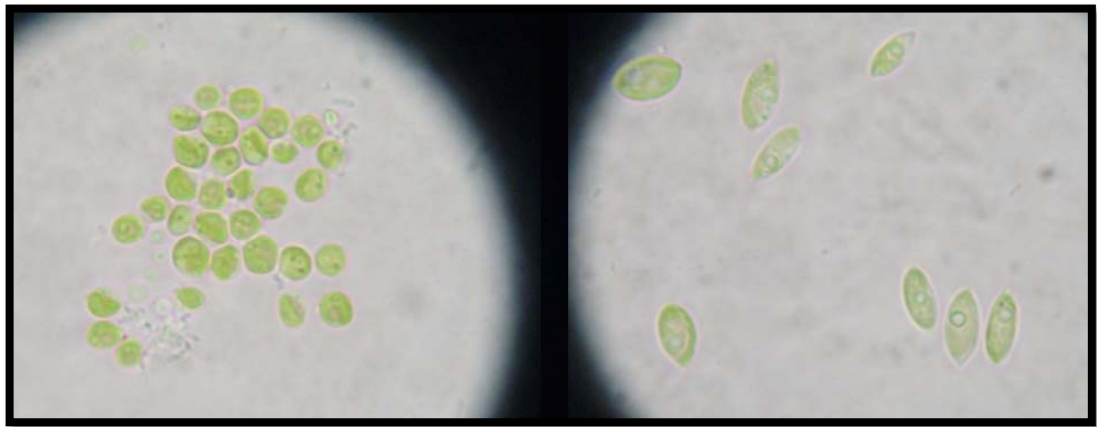


Figura 3 Microalgas *Chlorella vulgaris* (izquierda), *Scenedesmus obliquus* (derecha). Foto tomada en los laboratorios de la facultad ingeniería de la Universidad de La Sabana.

Se ha reportado (Avagyan 2008) que el riego de cultivos de trigo y arroz con suspensiones de microalgas tiene numerosos beneficios para los mismos, de igual manera que el remojo de semillas antes de su siembra en suspensiones de microalgas incrementando sus tasas de germinación y productividad.

Tabla 10 Composición de aminoácidos de la proteína de las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.

| AA | <i>Chlorella vulgaris</i> | | <i>Scenedesmus obliquus</i> |
|------------|---------------------------|-----------|-----------------------------|
| Ile | 3.8 (a) | 4.82 (b) | 3.6 (a) |
| Leu | 8.8 (a) | 10.78 (b) | 7.3 (a) |
| Val | 5.5 (a) | 7.86 (b) | 6.0 (a) |
| Lys | 8.4 (a) | 7.70 (b) | 5.6 (a) |
| Phe | 5.0 (a) | 6.02 (b) | 4.8 (a) |
| Tyr | 3.4 (a) | 3.02 (b) | 3.2 (a) |
| Met | 2.2 (a) | 1.55 (b) | 1.5 (a) |
| Cys | 1.4 (a) | 0.5 (b) | 0.6 (a) |
| Try | 2.1 (a) | 1.1 (b) | 0.3 (a) |
| Thr | 4.8 (a) | 5.6 (b) | 5.1 (a) |
| Ala | 7.9 (a) | 7.18 (b) | 9.0 (a) |
| Arg | 6.4 (a) | 7.97 (b) | 7.1 (a) |
| Asp | 9.0 (a) | 10.39 (b) | 8.4 (a) |
| Glu | 11.6 (a) | 11.6 (b) | 10.7 (a) |
| Gly | 5.8 (a) | 5.05 (b) | 7.1 (a) |
| His | 2.0 (a) | 2.40 (b) | 2.1 (a) |
| Pro | 4.8 (a) | 3.88 (b) | 3.9 (a) |
| Ser | 4.1 (a) | 3.50 (b) | 4.2 (a) |

Valores expresados como as g/100 g proteína (a) Becker 2007, (b) Morris-Quevedo et al. 1999.

El estudio del efecto de riego de plantas de trigo utilizadas para la producción de pan (*Triticum aestivum L., cv. Giza 94*), con agua de mar en concentraciones de 10 y 20% v/v, y regadas con extractos de microalgas obtenidos de *Chlorella ellipsoidea* y *Spirulina máxima* (soluciones 5g/L peso seco y 0.1% de surfactante Tween) cultivadas bajo condiciones normales y de estrés, se observó una fuerte correlación positiva entre el incremento de peso fresco, peso de grano y productividad, concluyendo que es posible obtener un cultivo productivo de trigo con riego con agua salobre al 20% v/v si se agregan extractos de algas a dicho sistema de riego (Hanna et al. 2008).

Molnar y Ördög (2005), encontraron que el uso de soluciones de biomasa liofilizada de microalgas y cianobacterias en la proporción de 1g.L⁻¹ y 2g.L⁻¹ permitieron mejorar un medio de cultivo para estudios in vitro de cultivos de arveja, tabaco y remolacha.

Faheed y Abd-El Fattah (2008) reportaron el efecto de adicionar la microalga *Chlorella vulgaris* a un medio de cultivo para la germinación de semillas de *Lactuca sativa* sobre sus parámetros de crecimiento y respuestas fisiológicas. Evaluaron el crecimiento de los germinados de lechuga a 3, 6, 9, 12 y 15 días, encontrándose que el tratamiento microalgal incrementó significativamente el crecimiento de las plántulas, con una disminución significativa en el contenido de carbohidratos solubles, y aminoácidos libres en comparación con el control (medio de cultivo esterilizado). La adición de microalgas al medio de cultivo o sustrato de crecimiento, produjo un incremento de peso fresco, peso seco y en el contenido de pigmentos. Los mejores tratamientos encontrados fueron los de 2 y 3g de alga por kg de sustrato.

Abd el Moniem y Abd-Allah (2008), reportaron de igual manera la aplicación de extractos algales de *Chlorella vulgaris* al cultivo de uvas vinícolas. La adición de extractos algales en concentración de un 25 y 100% produjo efectos positivos sobre el porcentaje de bulbos productivos respecto al tratamiento control, de igual manera observaron que características como el área foliar, longitud de los tallos y número de hojas y brotes, se vieron mejoradas por la aplicación de extractos de algas de un 25 a 100% sobre el control. También observaron un ligero incremento en la productividad de las viñas expresado en el número de clústeres y el peso de las uvas, y en un tiempo reducido en la maduración y calidad de los frutos, así como mejoras en la cantidad de azúcares y la disminución de la acidez en comparación con el control.

En un estudio sobre el empleo de una solución 50%v/v de extracto de microalga *Chlorella vulgaris* como fertilizante foliar en trigo (Shaaban 2001a), se encontró un efecto superior que el uso de una solución de micronutrientes produciendo un incremento de hasta un 140% en productividad y hasta en un 40% en peso de grano en comparación con el control de agua destilada.

En otro estudio desarrollado en Egipto (Shaaban 2001b), se evaluó el uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en forma seca como aditivo para el suelo sobre el estado nutritivo de tallos y raíces de plantas de maíz (*Zea mays*), en el que se encontró un incremento

significativo sobre la cantidad de nutrientes absorbido por los tallos y raíces, y se observó incrementos en el volumen de raíces, formación de clorofila y peso seco de tallos y raíces así como en la altura de las plantas.

Estos estudios, referencian la posibilidad del uso de extractos de microalgas sobre la productividad y calidad de estos cultivos, lo que aunado con la posibilidad de incrementar el contenido de compuestos funcionales dada una mejor fertilización de cultivos, hace necesario el estudio de la relación entre la aplicación de extractos de microalgas al cultivo de vegetales como lo es el brócoli capaces de producir fitoquímicos de interés para la salud de la población.

3. METODOLOGÍA

3.1 PRODUCCIÓN DE LAS MICROALGAS CHLORELLA VULGARIS UTEX 265 Y SCENEDESMUS OBLIQUUS UTEX 393

El cultivo de las especies de microalgas *Chlorella vulgaris*, cepa UTEX 265, y *Scenedesmus obliquus* cepa UTEX 393 se realizaron en las instalaciones del Biocentro de La Universidad de La Sabana durante los meses de septiembre de 2009 a mayo de 2010.

La producción de estas especies de microalgas se realizó sobre medio de cultivo Bristol modificado (Tabla 11), en seis fotobioreactores cerrados de vidrio, tipo columna de burbujeo, todos con un volumen de trabajo de 5 L (Figura 4). Se utilizaron tres reactores por especie.

Tabla 11 Composición del medio de cultivo Bristol modificado, fuente: UTEX.

| Medio de Cultivo Bristol: Composición: | |
|--|-------------------------------|
| Reactivo | Cantidad (g.L ⁻¹) |
| NaNO ₃ | 0,25 |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,025 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,075 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,075 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,175 |
| NaCl | 0,025 |
| Solución P-IV Metal | |
| Vitaminas | |
| Solución P-IV Metal: | |
| Reactivo | Cantidad (g.L ⁻¹) |
| Na ₂ EDTA. 2H ₂ O | 0,75 |
| FeCl ₃ . 6H ₂ O | 0,097 |
| MnCl ₂ . 4H ₂ O | 0,041 |
| ZnCl ₂ | 0,005 |
| CoCl ₂ . 6H ₂ O | 0,002 |
| Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O | 0,004 |
| Compuesto | Cantidad (g.L ⁻¹) |
| HEPES Buffer pH 7,8 | 12 |
| Biotina | 0,025 |
| Compuesto | Cantidad (g.L ⁻¹) |
| HEPES Buffer pH 7,8 | 12 |
| Tiamina | 0,025 |
| Fuente: Universidad de Texas (UTEX) | |

Los equipos se operaron con fotoperiodos de 18 horas luz, utilizando iluminación frontal por medio de tubos fluorescentes (Enerlux T5 – 14W), con una irradianza promedio de 50-60 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ (medido con un sensor QSPL 2101 de Biospherical Instrumetns Inc.). La temperatura de incubación no fue controlada, pero el monitoreo de la misma, indicó que se mantuvo en un rango de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La agitación al medio de cultivo fue suministrada mediante una mezcla aire/ CO_2 ($1.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, 4% de CO_2), por burbujeo en el fondo del recipiente, a través de tubing de acero inoxidable.

Los inóculos fueron preparados para cada microalga a partir de cepas conservadas en agar solidificado en medio Bristol modificado. La activación se realizó en frascos Erlenmeyer estériles con 250 mL de medio de cultivo Bristol modificado líquido, mantenido bajo condiciones de 24 h luz, temperatura promedio de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 10 días, al final de los cuales, los inóculos alcanzaban una concentración aproximada de $1,5\cdot 10^7 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$. A partir de la concentración a la que se encontraba el inóculo de cada microalga, se calculaba el volumen necesario de cada uno para obtener en los fotobioreactores de 5L una concentración inicial de $5\cdot 10^4 \text{ cel}\cdot\text{mL}^{-1}$.



Figura 4 Fotobioreactores de columna de burbujeo de 5L de capacidad, fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana.

A los inóculos se les efectuó pruebas microbiológicas según la metodología reseñada por Stirk et al. (2002), y que consiste en dispersar una suspensión diluida del cultivo sobre la superficie de un medio nutriente solidificado enriquecido con 0.5% de glucosa, 0.5%

peptona, y 1% extracto de levadura, con incubación a 37°C durante 7 días, luego de los cuales, la ausencia de colonias fúngicas o de bacterias se consideró indicativo de que el cultivo era axénico. Por observación directa al microscopio, se determinó la no presencia de otros organismos contaminantes, durante las etapas de crecimiento y producción.

Una vez inoculados los fotobioreactores, el cultivo se mantuvo durante 10 días, luego de los cuales se logró alcanzar concentraciones celulares promedio de $1,2 \cdot 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ en *Chlorella* y de $2,3 \cdot 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$ en *Scenedesmus*. Al cabo de estos 10 días, el volumen de 5L de cada fotobioreactor se transfirió a varios recipientes estériles de 3L de capacidad, en los que se dejó reposar, produciéndose al cabo de 8 días en ausencia de luz, la sedimentación de las células de microalgas, dejando el sobrenadante clarificado y en gran parte libre de células.

El sobrenadante clarificado se separó de la biomasa sedimentada por decantación, utilizando para ello una manguera siliconada estéril, el sobrenadante se filtró y se reservó para su uso posterior en la preparación de los tratamientos. Las células sedimentadas del mismo tipo de microalgas se recolectaron, congelaron y liofilizaron en un equipo LABCONCO Modelo 79480, durante 48h a 37°C con una presión de vacío de 22 PSI. La biomasa liofilizada (Figura 5) se mantuvo almacenada en un desecador con humedad controlada de 11% empleando sílice para tal fin, hasta el momento de su uso en la preparación de soluciones de tratamiento.



Figura 5 Biomasa liofilizada de microalgas *Chlorella vulgaris* (izquierda) y *Scenedesmus obliquus* (derecha). Fotografía tomada en los laboratorios de ingeniería de la Universidad de La Sabana

3.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE MICROALGAS:

Los trabajos realizados de Molnar y Ördög (2005) y Faheed y Abd-El Fattah (2008) sirvieron como base para la selección de los tratamientos a emplear en este trabajo. De cada microalga se prepararon 4 soluciones de concentración 1g.L^{-1} y 2g.L^{-1} en peso seco (PS) de biomasa liofilizada (Figura 5), utilizando para la preparación de estas soluciones agua destilada estéril o sobrenadante del medio de cultivo gastado filtrado, un quinto tratamiento consistió únicamente en sobrenadante del medio de cultivo gastado de la correspondiente microalga. Adicionalmente, se emplearon dos tratamientos como control, el primero de agua destilada estéril, y el segundo, una solución de fertilizante comercial. En la Tabla 12 se detallan los tratamientos y las siglas que se emplearon para identificar cada uno de ellos:

Tabla 12 Descripción de los tratamientos aplicados a las semillas de brócoli empelados en la evaluación del efecto de los mismos sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados.

| Nombre del tratamiento | <i>Chlorella vulgaris</i> | <i>Scenedesmus obliquus</i> | 1g.L ⁻¹ PS | 2g.L ⁻¹ PS | Sobrenadante del medio de cultivo gastado de cada microalga | Agua destilada estéril | Fertilizante comercial (1% p/v)* |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|---|------------------------|----------------------------------|
| Agua | | | | | | ✓ | |
| Fert | | | | | | ✓ | ✓ |
| ChAg1 | ✓ | | ✓ | | | ✓ | |
| ChAg2 | ✓ | | | ✓ | | ✓ | |
| ChSo | ✓ | | | | ✓ | | |
| ChSo1 | ✓ | | ✓ | | ✓ | | |
| ChSo2 | ✓ | | | ✓ | ✓ | | |
| ScAg1 | | ✓ | ✓ | | | ✓ | |
| ScAg2 | | ✓ | | ✓ | | ✓ | |
| ScSo | | ✓ | | | ✓ | | |
| ScSo1 | | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| ScSo2 | | ✓ | | ✓ | ✓ | | |

*Fertilizante comercial al 1%, Marca Raizal 400 de GBM (Grupo Bioquímico Mexicano, lote 22-03-2008, composición: Nitrógeno Total (N): 9% (N amoniacal 7% y N nítrico 2%), Fósforo Asimilable (P₂O₅) 7%, Potasio Soluble en H₂O (K₂O) 11%, Magnesio (MgO) 1%, Azufre Total (S) 0.8%, Auxinas 0.04%)

3.3 APLICACIÓN DE EXTRACTOS DE MICROALGAS

Con base en un diseño experimental de bloques completos al azar, se emplearon 36 bandejas plásticas (tres bandejas para cada tratamiento), provistas con dos papeles absorbentes doblados en forma de acordeón, sobre los cuales se aplicaron 50mL de cada solución de tratamiento (Figura 6). En cada bandeja se colocó a germinar 1.1g de semillas de brócoli (aprox. 200 semillas) y se cubrieron con una película plástica transparente para evitar su contaminación con el ambiente, así como la evaporación de la solución. Los germinados obtenidos luego de 7 y 14 días de crecimiento fueron recolectados de forma manual entre las 8 y 10 am del día, dependiendo de la prueba que se estuviese analizando. Para el caso de los germinados de 14 días, fue necesario humidificar las bandejas con agua destilada estéril luego de 7 días de experimentación.

De manera aleatoria, se seleccionó 8 germinados por bandeja para realizar medidas de longitud de tallo y raíz (5 germinados fueron analizados mediante imágenes con el software ImageJ de libre uso, Figura 7), y medidas de peso fresco y peso seco (3 germinados fueron pesados en estado fresco, y luego de permanecer en estufa a 65°C durante 24horas, tiempo y temperatura en el que se alcanza peso constante).



Figura 6 Germinados de brócoli cultivados sobre soluciones de tratamiento con microalgas. Fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana



Figura 7 Ejemplo de medidas de altura y longitud de raíz de los germinados para análisis por imágenes. Fotografía tomada en el Biocentro de la Universidad de La Sabana

3.4 ANÁLISIS DE FITOQUÍMICOS EN LA MATERIA VEGETAL:

Para determinar el efecto de las soluciones de microalgas sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli, se determinó el contenido de β -caroteno, ácido ascórbico, sulforafane y actividad antioxidante de los germinados obtenidos luego de 7 y 14 días de crecimiento en bandejas plásticas impregnadas con las 12 soluciones descritas en la Tabla 12.

3.4.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante se analizó siguiendo la metodología descrita por Zhang y Hamauzu (2004) con algunas modificaciones. Se maceró de forma manual 0.5g de materia prima liofilizada hasta el menor tamaño de partícula posible. La muestra macerada se homogenizó con un Ultraturax (Janke & Kunkel IKA® LABOR TECHNIK, Ultra-turrax T25, con rango de velocidad de 8000-24000rpm), a una velocidad aproximada de 10000rpm con 30 mL de metanol (80% v/v), y se dejó reposar durante 60 min. Posteriormente, se filtró con 15 mL de metanol (80% v/v), y el filtrado se centrifugó a 6000

x g durante 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se filtró para eliminar partículas sólidas que afectarían las mediciones de absorbancia. Con el extracto obtenido, se hicieron dos diluciones (100% y 50% en metanol) para la medición de la actividad antioxidante. A 0.2 mL de extracto se le adicionó 4 mL de DPPH y se dejó reaccionar por 60 min a temperatura ambiente en ausencia de luz. Las lecturas se realizaron en celdas de plástico a 517nm (Espectrofotómetro Genesys 10 UV Scanning). La actividad antioxidante obtenida se expresó como el porcentaje de decrecimiento de DPPH.

3.4.2 DETERMINACIÓN DE B-CAROTENO

Para la determinación de β -caroteno se maceró 0.5g de materia prima liofilizada hasta obtener el menor tamaño de partícula posible. La muestra macerada se homogenizó a una velocidad aproximada de 10000rpm mediante Ultraturax (Janke & Kunkel IKA® LABOR TECHNIK, Ultra-turrax T25, con rango de velocidad de 8000-24000rpm), con 15 mL de una solución acetona:hexano (1:9), finalizada la homogenización se añadieron otros 15 mL de la solución de acetona:hexano (1:9) y se dejó en reposo durante 60 min (el recipiente que contiene la muestra debe estar sellado herméticamente para evitar la evaporación de la solución). Finalizado el tiempo de reacción la muestra se filtró en un sistema de vacío, y se aforó a un volumen de 25 mL con la solución solvente de acetona:hexano (1:9). De esta muestra se tomó 0.6 mL en un tubo de ensayo y se adicionó 4 mL de éter de petróleo, la mezcla se agitó por 30 segundos y se midió su absorbancia mediante espectrofotómetro a una longitud de onda de 449 nm (Espectrofotómetro Varian, Modelo Cary 100 Conc UV-Visible).

3.4.3 DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)

Para determinar el ácido ascórbico presente en las muestras, se modificó la metodología señalada por Zhang y Hamauzu (2004). Se maceró 0.5g de materia prima liofilizada hasta obtener el menor tamaño de partícula posible. La muestra macerada se homogenizó con Ultraturrax (Janke & Kunkel IKA® LABOR TECHNIK, Ultra-turrax T25, con rango de velocidad de 8000-24000rpm), a una velocidad aproximada de 10000rpm con 15mL de una solución de ácido metafosfórico al 5%. Se filtró y el residuo se trató con 10mL de ácido metafosfórico, dejando en reposo por 2 horas. Se combinaron las fracciones de ácido metafosfórico y se descartaron los sólidos, el filtrado se llevó a 25 mL; y finalmente la solución se filtró a través de membrana de 0.45 μm . Se mantuvieron en congelación a -4°C hasta su análisis por HPLC. La fase móvil consistió de la solución de ácido metafosfórico, con una velocidad de flujo de $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, y se detectó el ácido ascórbico a 254 nm.

3.4.4 DETERMINACIÓN DE SULFORAFANE

El sulforafane se determinó siguiendo la metodología descrita por Liang et al. (2006) con ligeras modificaciones. Se homogenizó 0.5 g de muestra liofilizada hasta obtener el menor tamaño de partícula posible con Ultraturrax (Janke & Kunkel IKA® LABOR TECHNIK, Ultraturrax T25, con rango de velocidad de 8000-24000rpm), a una velocidad aproximada de 10000rpm con 25 mL de agua destilada y se dejó en autólisis a temperatura ambiente durante 60 min. Se realizó una extracción con 40 mL de cloruro de metileno y 0.5 g de sulfato de sodio anhidro por 24 h. La mezcla se llevó a un embudo de separación de fases, y se descartó la fase acuosa. La fase orgánica se recuperó a temperatura ambiente. Los sólidos fueron recuperados con 10mL de acetonitrilo, y se filtraron mediante membranas de 0.22 μm para el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, Marca Varian ProStar Autosampler, modelo 410, lámpara de 10v Photron), empleándose una columna de

fase reversa C18. El sistema de solvente consistió en una solución de concentración 20% de acetonitrilo en agua, y se varió linealmente durante 10min hasta alcanzar la concentración de 60% acetonitrilo (la purga de la columna se realizó mediante acetonitrilo 100% durante 2 min).

El equipo de HPLC se operó a temperatura de 30°C, velocidad de flujo de 1 mL.min⁻¹, y la inyección de muestra se realizó en alícuotas de 20 µL. El sulforafane se detectó con una absorbancia de 254 nm, para lo cual se requirió preparar una curva de calibración basada en el método de estándar externo, mediante la preparación de una solución madre con 5.0 mg de sulforafane grado estándar (SIGMA), disuelto, y diluido con 10 mL de acetonitrilo. Se tomaron alícuotas incrementales de la solución madre y se transfirió a frascos de 10 mL, diluidos con acetonitrilo para preparar la curva.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

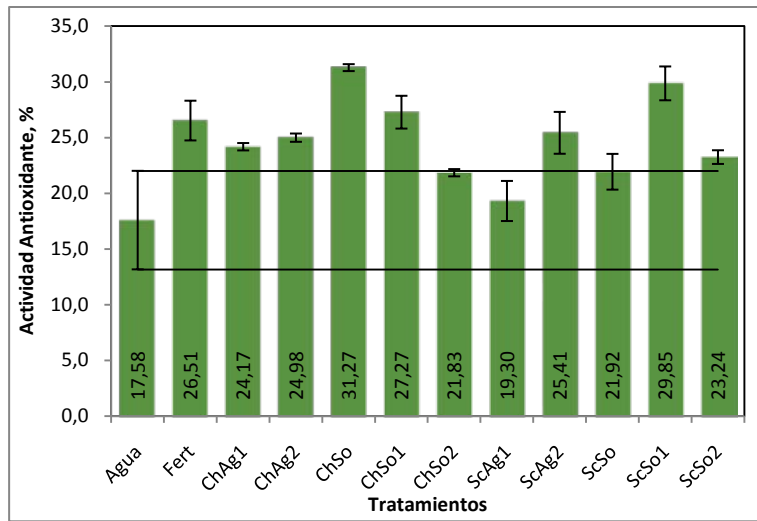
A continuación se presentan los resultados obtenidos sobre el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli cultivados sobre soluciones de tratamiento con microalgas descritas en la Tabla 12, durante 7 y 14 días. También se presentan algunos datos sobre el efecto de las mismas sobre el crecimiento de los germinados.

4.1 CONTENIDO DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN BRÓCOLI

4.1.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

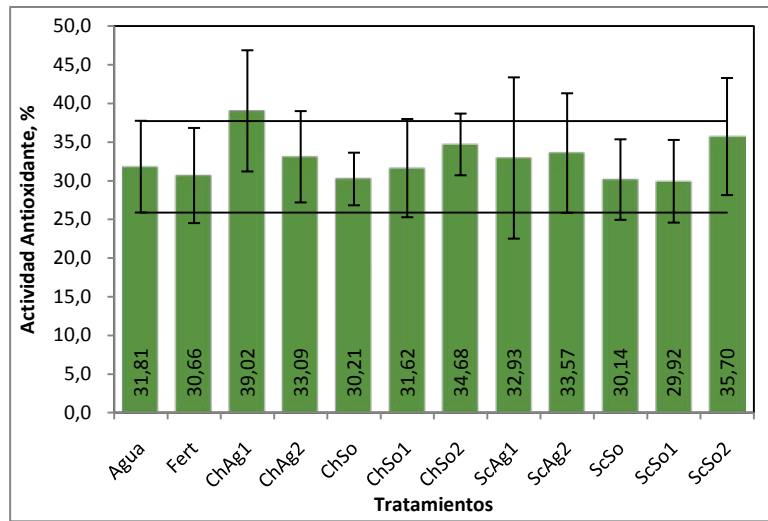
Los resultados de los análisis sobre capacidad antioxidante expresados como porcentaje de reducción de radicales DPPH de los germinados de 7 y 14 días, se presentan en la Gráfica 1 y Gráfica 2, respectivamente. Los datos tabulados se pueden encontrar en el anexo 1, en la Tabla 17 para los datos de los germinados de 7 días, y en la

Tabla 18 para los germinados de 14 días. Los resultados del ANOVA del análisis comparativo de medias se presentan en el anexo 2.



Gráfica 1 Capacidad antioxidante promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresada como % de capacidad reductora de DPPH

Los resultados de capacidad antioxidante de extractos de los germinados de 7 días presentan diferencias significativas entre tratamientos, pero comparando los resultados de esta prueba con los del control (agua), todos los tratamientos exceptuando ChSo2, ScAg1 y ScSo, presentan diferencias significativas. El tratamiento ChSo (Sobrenadante del medio de cultivo de *Chlorella*) con un valor de $31.27 \pm 0.311\%$ fue el tratamiento que presentó la mayor actividad antioxidante.



Gráfica 2 Capacidad antioxidante promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresada como % de capacidad reductora de DPPH

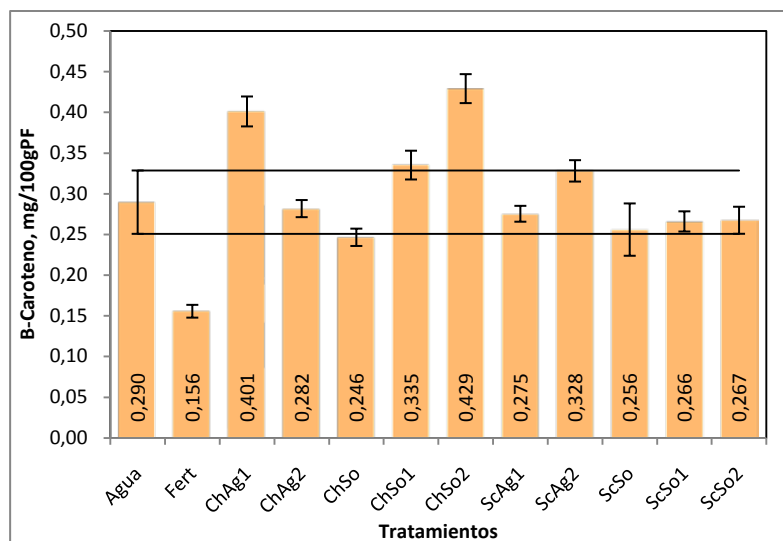
En lo que respecta al análisis estadístico de los resultados sobre la capacidad antioxidante de los extractos de germinados de 14 días, en la Gráfica 2 observa una alta desviación estándar entre los tratamientos, por lo que no puede determinarse una clara diferenciación entre los resultados obtenidos, como si se observó en los tratamientos a los 7 días. Es posible que en las etapas más tempranas se exprese más fuertemente la actividad antioxidante en los germinados, como mecanismo de protección de los mismos, o como consecuencia del efecto de los tratamientos con microalgas, pero esto debería ser investigado con más detalle antes de poder concluir algo al respecto.

La determinación de la actividad antioxidante de extractos de plantas sigue siendo un problema no resuelto, tal y como se mostró en el estado del arte existen alrededor de 20 métodos analíticos que involucran el empleo de diferentes reactivos, composiciones de mezclas reactivas, estándares, evaluaciones analíticas y otros aspectos, haciendo que la comparación exacta entre resultados de diferentes investigaciones sea una labor casi imposible. Por lo tanto, podría discutirse, que la metodología empleada para determinar la capacidad antioxidante de los germinados de brócoli en este trabajo, no fue la más adecuada, y que por ello se observaron bajas actividades (<50%).

Pero, según el trabajo de Kurilich (2002), los extractos de tipo acuosos o hidrofílicos, contribuyeron con más del 80% de la capacidad antioxidante medida en brócoli. Dado que esta metodología se empleó metanol, solvente de carácter polar, se considera que debieron extraerse principalmente compuestos de tipo hidrofílicos así como algunos lipofílicos, teniendo posibilidades para realizar una buena medida de la capacidad antioxidante de los germinados. Adicionalmente, según las investigaciones de Martínez-Sánchez et al. (2008) y Heimler et al. (2006) sobre actividad antioxidante en especies de vegetales del tipo Brassicaceae, es posible considerar que la metodología por DPPH es adecuada para la determinación de actividad antioxidante en extractos de germinados de brócoli, aunque no se descarta que existan métodos mejores y más exactos para este tipo de determinaciones.

4.1.2 CONTENIDO DE B-CAROTENO

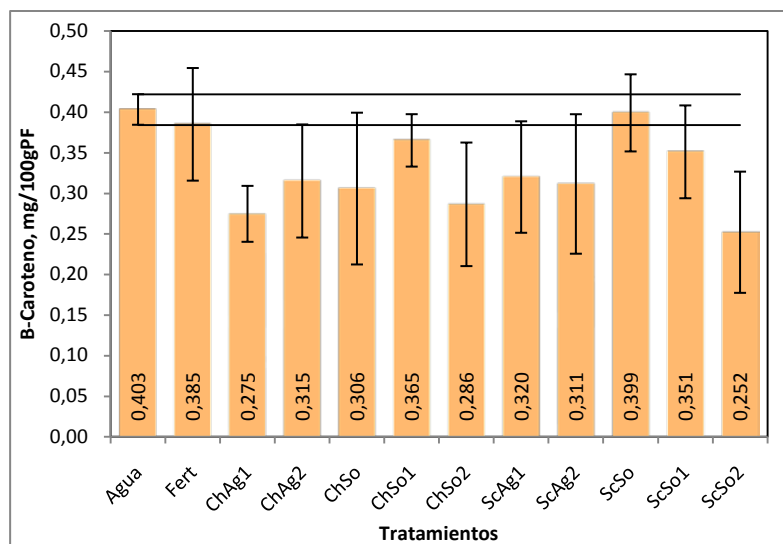
Los resultados de los análisis realizados a los germinados de 7 días sobre el contenido de β -Caroteno, se presentan en la Gráfica 3 expresados como mg/100g PF. Los resultados para los germinados de 14 días de edad se presentan en la Gráfica 4. En ambos casos, se observan diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con un error de 0.05. Las tablas de datos se presentan en el anexo 1, y los resultados del ANOVA se presentan en el anexo 2.



Gráfica 3 Contenido promedio de β -caroteno en germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg/100g PF

Respecto al contenido de β -caroteno en los germinados de 7 días del tratamiento control (0.290 ± 0.039 mg/100g PF) los tratamientos ChAg1 (0.401 ± 0.018 mg/100g PF) y ChSo2 (0.429 ± 0.018 mg/100g PF) presentaron diferencias significativas positivas. Mientras que el tratamiento Fert presenta una diferencia significativa pero con un promedio inferior al contenido de β -caroteno de las muestras control (agua).

Se observan diferencias significativas entre los tratamientos a 14 días, pero al comparar los tratamientos de microalgas con el control (agua), y representados en la Gráfica 4 se observa que todos los tratamientos presentan una disminución en el contenido promedio de β -caroteno, pero que de ellos, únicamente, los tratamientos ChAg1, ChSo2 y ScSo2 presentan diferencias significativas en la concentración inferior al tratamiento control.



Gráfica 4 Contenido promedio de β -carotenos en germinados de brócoli de 14 días expresados como mg/100g PF

El tratamiento control (agua) en germinados de 14 días, contiene la mayor concentración (0.403 ± 0.019 mg/100g PF) de β -Caroteno, y presenta diferencias significativas con el contenido de los germinados de los tratamientos ChAg1 (0.275 ± 0.034 mg/100g PF), ChSo2 (0.286 ± 0.076 mg/100g PF), y ScSo2 (0.252 ± 0.075 mg/100g PF), pero con un promedio de concentración inferior (Gráfica 4) a la obtenida en el tratamiento agua, representando una disminución del contenido de β -caroteno de 21.9%, 29.0% y 37.5% respecto a este control.

La concentración promedio de β -caroteno en los germinados de brócoli de 7 días se encuentra en el rango 0.156-0.429 mg/100g PF, y las de 14 días se encuentra en el rango de 0.252-0.403 mg/100g PF. No se encontraron trabajos en los que se cuantifiquen carotenoides en germinados de brócoli, por lo que no fue posible establecer comparaciones. Otros investigadores reportan el contenido de β -Caroteno en las partes comestibles de brócoli en rangos muy diversos desde 0.28-2.42 mg/100g PF (Podsdek 2007) y de 0.05-0.77 mg/100g PF (Schonfof et al. 2007). El contenido de este compuesto en los germinados de 7 y 14 días, se halla en los límites inferiores de los rangos reportados por dichos investigadores, esto significaría, que los germinados de brócoli de 7 y 14 días contienen una

concentración similar de β -caroteno al de las inflorescencias de algunas variedades de brócoli.

4.1.3 CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

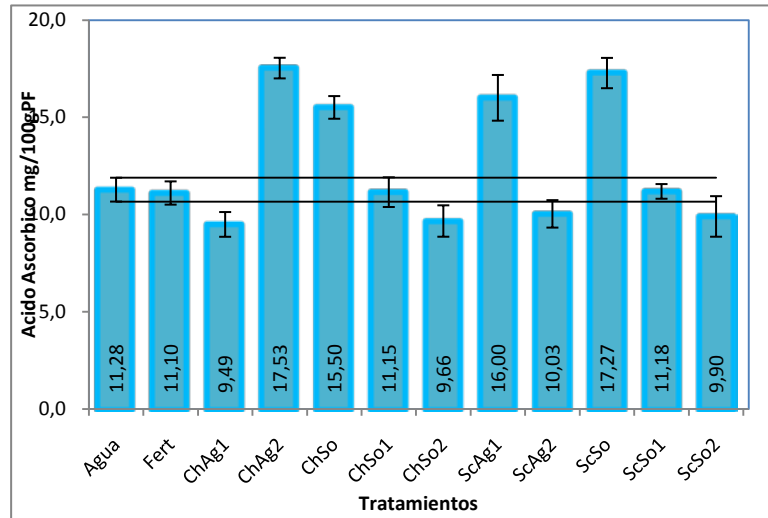
En ambos experimentos se observó que los tratamientos con microalgas permitieron incrementar el contenido de ácido ascórbico en los germinados de brócoli. Específicamente en los tratamientos ScSo, ChAg2, ScAg1 y ChSo1 (Sobrenadante de *Scenedesmus*, 2 g.L⁻¹ PS de células de *Chlorella* en agua, 1 g.L⁻¹ PS de células de *Scenedesmus* en agua, y 1 g.L⁻¹ PS de células de *Chlorella* en sobrenadante respectivamente), se observó un contenido significativamente superior de ácido ascórbico en comparación con los germinados cultivados sobre agua.

El promedio de los resultados de los análisis realizados a los germinados de 7 y de 14 días sobre el contenido de ácido ascórbico, se presentan en la Gráfica 5 para las de 7 días, y en la Gráfica 6 para las de 14 días, expresados como mg/100g PF. Estos contenidos presentaron diferencias significativas entre medias para los diferentes tratamientos con un valor de significancia de 0.05. Las tablas de datos correspondientes a las medidas de ácido ascórbico se pueden encontrar en el anexo 1, y las correspondientes al análisis estadístico en el anexo 2.

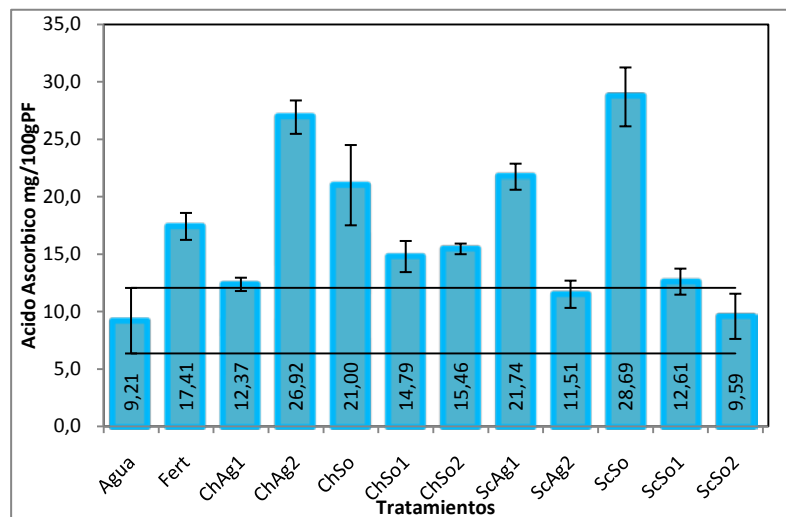
El tratamiento control (agua) a los 7 días, produjo germinados con una concentración promedio de ácido ascórbico de 11.28±0.613mg/100g PF. Los tratamientos ChAg2 (17.53±0.531mg/100g PF), ChSo (15.50±0.583mg/100g PF), ScAg1 (16.0±1.176mg/100g PF) y ScSo (17.27±0.780mg/100g PF) presentaron diferencias significativas positivas frente al promedio del control (agua).

El tratamiento control (agua) de germinados a los 14 días tuvo una concentración promedio de 9.21±2.85mg/100g de ácido ascórbico. Los tratamientos con la microalga *Chlorella* presentaron concentraciones significativamente ($\alpha=0.05$) superiores a los del tratamiento control (agua), siendo la mayor concentración de 26.92±1.45mg/100g PF de ácido

ascórbico para el tratamiento ChAg2 (2g/L de células de *Chlorella* en agua). De los tratamientos con *Scenedesmus*, solamente los tratamientos ScAg1 (21.74±1.13mg/100g PF) y ScSo (28.69±2.56mg/100g PF) presentaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) y superiores a las del control (agua).



Gráfica 5 Contenido de ácido ascórbico promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado como mg/100g PF



Gráfica 6 Contenido Promedio de ácido ascórbico en germinados de brócoli de 14 días expresado como mg/100g PF

El tratamiento que presentó la mayor concentración de ácido ascórbico fue ScSo (Sobrenadante del cultivo de *Scenedesmus*), correspondiendo a un valor 211,5% superior al del control (agua), seguido en orden descendente por los tratamientos ChAg2 (192,4%), ScAg1(136,1%), ChSo (128,1%), Fert (89.1%), ChSo2 (67.9%) y ChSo1 (60.6%).

La concentración de ácido ascórbico en los germinados de brócoli de 7 días oscila entre 9.49 y 17.53mg/100g PF y el contenido de los germinados de 14 días varió desde 9.21 hasta 28.69mg/100g PF. Este contenido de ácido ascórbico fue similar al que reporta la página www.brassica.com en el producto patentado BroccoSprouts®, así como a los valores encontrados por otros autores (Pérez-Balibrea et al. 2008) en germinados de brócoli bajo condiciones de oscuridad, pero inferiores a los que obtuvieron cuando cultivaron los germinados bajo $400\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de iluminación. En comparación con el contenido de ácido ascórbico en inflorescencias de brócoli, la concentración en los germinados fue cercana a la reportada por Favell (1998) en el trabajo de Posedek (2007).

El mayor contenido de ácido ascórbico en los germinados de brócoli cultivados sobre soluciones de microalgas, respecto a los tratados con agua y aquellos tratados con fertilizante comercial, pudiese significar que estas soluciones fueron capaces de promover más efectivamente el mecanismo de biosíntesis de vitamina C en la semilla germinante.

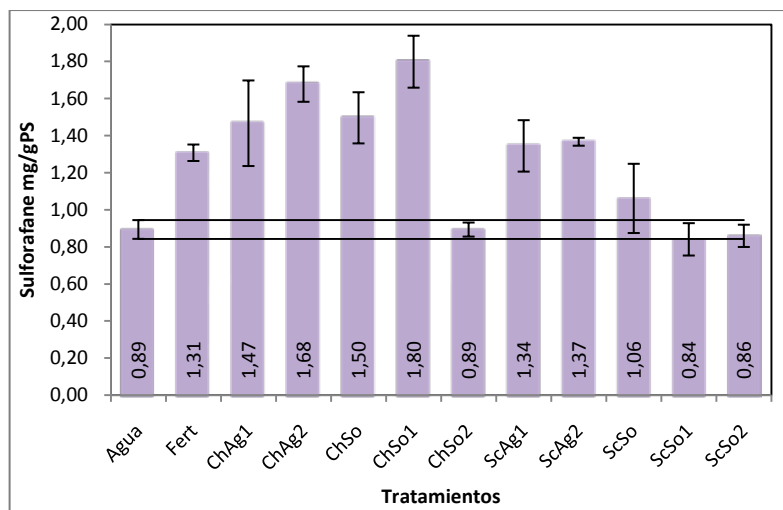
4.1.4 CONTENIDO DE SULFORAFANE

El observó un incremento significativo en el contenido del compuesto funcional sulforafane, en los germinados de brócoli cultivados sobre soluciones de microalgas comparado con el contenido de este fitoquímico en los germinados cultivados sobre agua.

El promedio de los análisis del compuesto sulforafane realizado a los germinados de 14 días de edad, con sus correspondientes desviaciones se reportan en la Gráfica 7 expresados en unidades de $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ PS. Estos resultados presentaron diferencias significativas entre tratamientos con un valor de significancia de 0.05. Las tablas de datos

se presentan en el anexo 1, y los resultados del ANOVA realizado a estos datos se presentan en el anexo 2 de este documento.

El análisis de contenido de sulforafane, por HPLC, de los germinados de 14 días de edad que corresponden al tratamiento control (agua) indica una concentración promedio de $0.89 \pm 0.051 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PS. Todos los tratamientos realizados con la microalga *Chlorella* exceptuando CHSo2 (solución $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de células de *Chlorella* en sobrenadante del cultivo), presentaron diferencias significativas respecto al tratamiento control (agua), y con promedio de contenido de sulforafane superiores a los de dicho control. De los tratamientos con la microalga *Scenedesmus*, los tratamientos ScAg1, ScAg2 y ScSo presentaron contenidos de sulforafane significativamente superiores a los del control (agua), mientras que los tratamientos ScSo1 y ScSo2, no presentaron diferencias significativas en la concentración de sulforafane con respecto a dicho control. De los tratamientos con la microalga *Scenedesmus*, ambas soluciones acuosas dieron resultados muy similares, con concentraciones de $1.34 \pm 0.139 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PS y $1.37 \pm 0.021 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PS, para los tratamientos ScAg1 y ScAg2 respectivamente.



Gráfica 7 Contenido promedio de sulforafane en germinados de brócoli de 14 días, expresado como mg/100g PS

La concentración de sulforafane en base a peso seco en los germinados de brócoli se encontraron en el rango de 0.84 – 1.80 mg.g⁻¹ PS, correspondiendo con resultados presentados por otros autores (Sivakumar et al. 2007), como por ejemplo, se reportó para la variedad de *Brassica Broccoli Primos (var. Itálica)* una concentración de 1.31mg.g⁻¹ PS y para la variedad *Brassica Ramoso Calabrese (var. Botrytis)* una concentración de 1.60mg.g⁻¹ PS ambos resultados para germinados de 9 días de edad contados a partir de su germinación (Sivakumar et al. 2007). Los germinados cultivados sobre el tratamiento ChSo1 (1g.L⁻¹ de células de *Chlorella* en sobrenadante de su propio cultivo), presentaron el mayor contenido de sulforafane (1.80±0.14mg.g⁻¹ PS).

La comparación de los valores de concentración de sulforafane con los reportados en otros trabajos es de especial interés, dado que se ha documentado extensamente que la concentración de sulforafane y de los glucosinolados en general, disminuye desde la semilla hasta el momento en que se inicia la formación de la florescencia de brócoli (Sivakumar et al. 2007), incrementándose nuevamente al alcanzar la madurez y nuevamente decrece cuando la planta florece, pero sin alcanzar los niveles encontrados en los germinados (Rangkadilok et al. 2002). De hecho, varios autores (Bellostas et al. 2007; Fahey et al. 1997; Pérez-Balibrea et al. 2008; Rangkadilok et al. 2002), han reportado que el contenido de sulforafane y su promotor, la glucorafanina en los germinados de brócoli puede ser de hasta 10 veces mayor que en las inflorescencias lo que ha llamado la atención a los germinados como un novedoso alimento o ingrediente funcional con mayor potencial que la inflorescencia comúnmente consumida.

No se han encontrado explicaciones documentadas por las cuales se produce la disminución en la concentración de glucosinolados desde la semilla hasta la etapa productiva del brócoli (Sivakumar et al. 2007), considerando que los germinados pueden estar sometidos a mayor estrés o que los genes asociados estén altamente expresados en esta temprana etapa, y por lo tanto desarrollan mayores niveles de sulforafane. Sin embargo, también se ha sugerido (Bellostas et al. 2007), que la disminución de glucosinolados en los tejidos de los germinados es consecuencia de un metabolismo selectivo de estos compuestos y una

dilución de la concentración debido a la expansión de los tejidos con el crecimiento, por ello, la baja concentración de estos compuestos en las inflorescencias.

Dado que se encontraron concentraciones de sulforafane en los germinados de 14 días similares a los encontrados en otros trabajos en germinados más jóvenes, sugiere que, sería altamente probable que en los germinados de 7 días podrían haberse encontrado concentraciones más altas que en los germinados de 14 días, indicando que los tratamientos con microalgas serían una buena alternativa para incrementar el contenido de sulforafane en los germinados de brócoli, en especial el tratamiento ChSo1, donde se obtuvieron concentraciones ligeramente mayores a las reportadas por Sivakumar et al. (2007).

De igual manera, se debe llamar la atención a que se encontraron resultados positivos con el tratamiento con soluciones de microalgas, mientras que en otros trabajos (Meyer y Adam 2008), se encontraron que no habían diferencias significativas en el contenido de glucosinolados cuando se compararon brócolis maduros producidos por fertilización convencional o por fertilización orgánica; y que en otro trabajo sobre el efecto de la fertilización con nitrógeno y azufre sobre el contenido de glucosinolados en germinados de brócoli de 11 días (Aires et al. 2006), se encontró una disminución en el contenido de glucorafanina (promotora de sulforafane) como consecuencia de los diferentes tratamientos de fertilización, respecto al control que empleó solamente agua, y se sugirió que aún los niveles más bajos de fertilización ejercían un efecto inhibitorio sobre el metabolismo de las plantas en esta etapa temprana, y que concentraciones de sal tan bajas como de 0.62g.L^{-1} redujeron el contenido de glucosinolados en los germinados de 11 días respecto al control.

El contenido de sales en el medio de cultivo de las microalgas, fue aproximadamente de 0.625g.L^{-1} cuando se inició el cultivo, por lo que en el caso de las soluciones de tratamiento que incluyeron sobrenadante en su formulación, era de esperarse una concentración de sales mucho inferior (no se analizaron) a la reportada por estos investigadores (Aires et al. 2006) debido al consumo de las mismas por las microalgas durante su crecimiento. Por lo tanto, en los tratamientos con microalgas en los que no se observaron diferencias significativas con el control (agua), no se considera que haya ocurrido un efecto inhibitorio por sales,

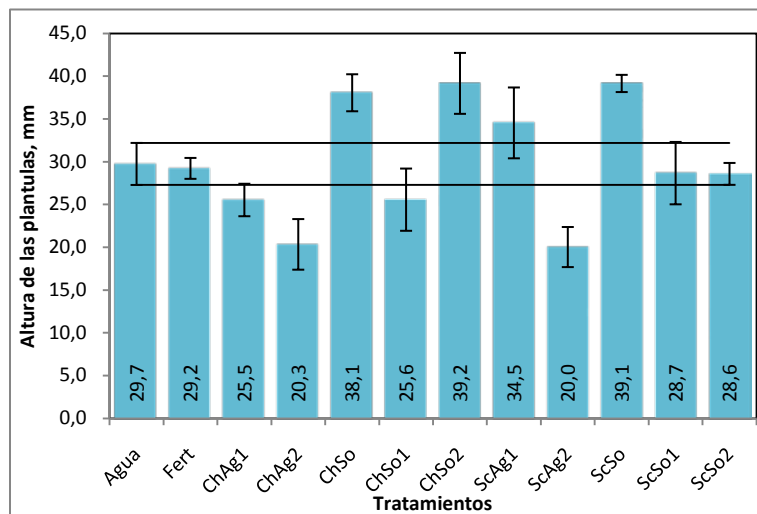
considerando que el tratamiento que produjo germinados con mayor contenido de sulforafane contenía sobrenadante de la microalga *Chlorella* (ChSo1).

El efecto de los tratamientos de microalgas en incrementar el contenido de sulforafane en los germinados de brócoli, puede hacerse dado por varios factores, entre ellos, se ha reportado el alto contenido de nutrientes que posee la biomasa de *Chlorella* (Faheed y Abd-El Fattah 2008), y aunque no se han encontrado referencias específicas sobre el uso de *Scenedesmus* en pruebas agronómicas, su composición es relativamente similar (Becker 2007), y por ello, muy probablemente suministra a los germinados con tipos y proporciones similares de nutrientes.

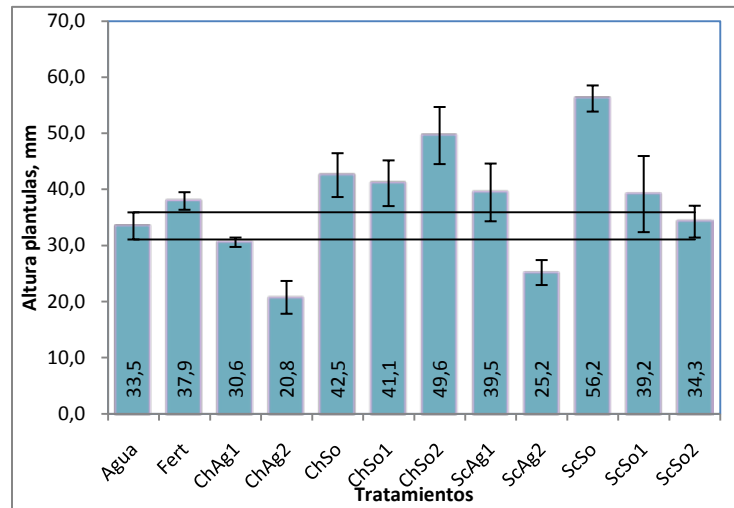
4.2 MEDIDAS DE CRECIMIENTO EN GERMINADOS DE BRÓCOLI

4.2.1 LONGITUD DE TALLO DE GERMINADOS

El promedio de las medidas de longitud de los germinados de 7 días, se presentan en la Gráfica 8, estos datos presentaron diferencias significativas en el ANOVA de un factor realizado con un valor de significancia de 0.05, presentado en el anexo de este documento. El promedio de los datos de longitud de los germinados de 14 días, se presentan en la Gráfica 9, el análisis estadístico, también indica diferencias significativas para este grupo de datos.



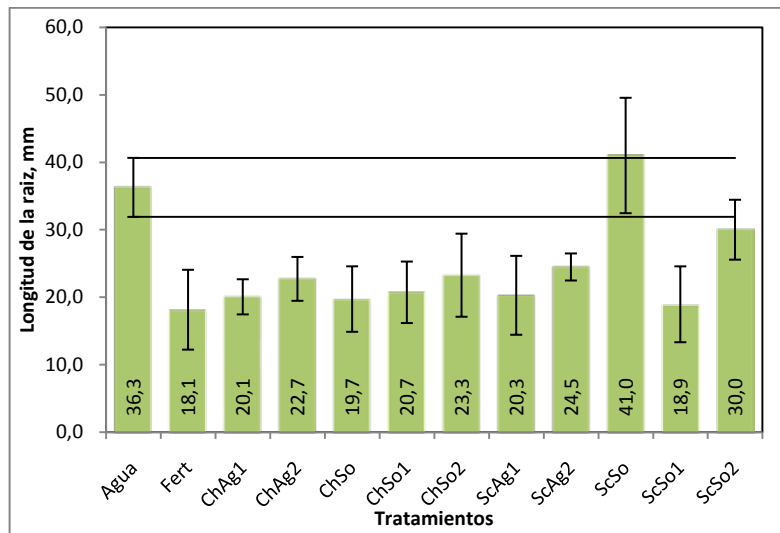
Gráfica 8 Promedio de la longitud de los germinados de brócoli de 7 días expresados en mm



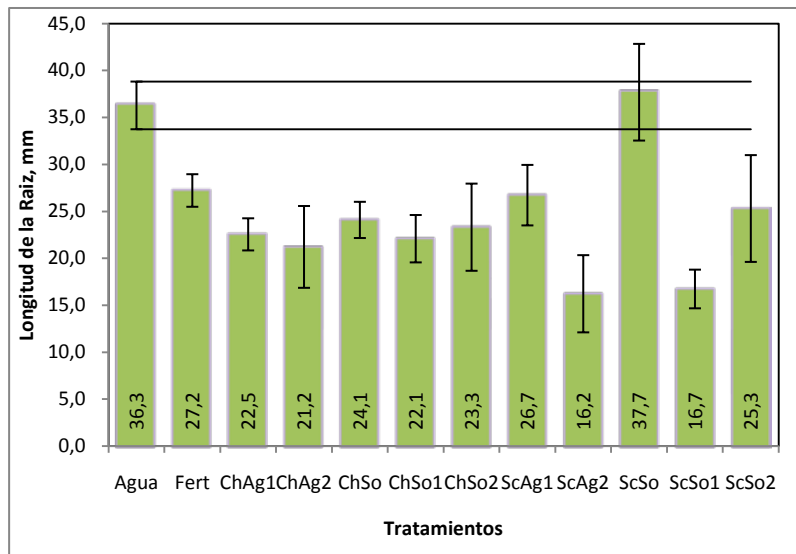
Gráfica 9 Longitud promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mm

4.2.2 LONGITUD DE RAÍZ DE GERMINADOS

El promedio de las medidas de longitud de raíz de los germinados de 7 días, se presentan en la Gráfica 10 expresadas en mm, estos datos presentaron diferencias significativas en el ANOVA de un factor realizado con un valor de significancia de 0.05, presentado en el anexo de este documento. El promedio de las medidas de longitud de raíz de los germinados de 14 días, se presentan en la Gráfica 11 expresados en mm, el análisis estadístico, también indica diferencias significativas para este grupo de datos.



Gráfica 10 Longitud de raíz promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mm

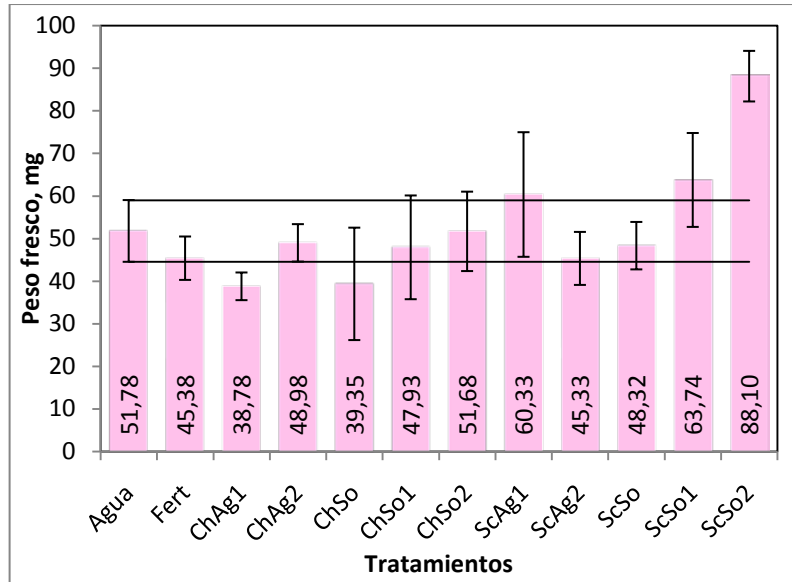


Gráfica 11 Longitud de raíz promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mm.

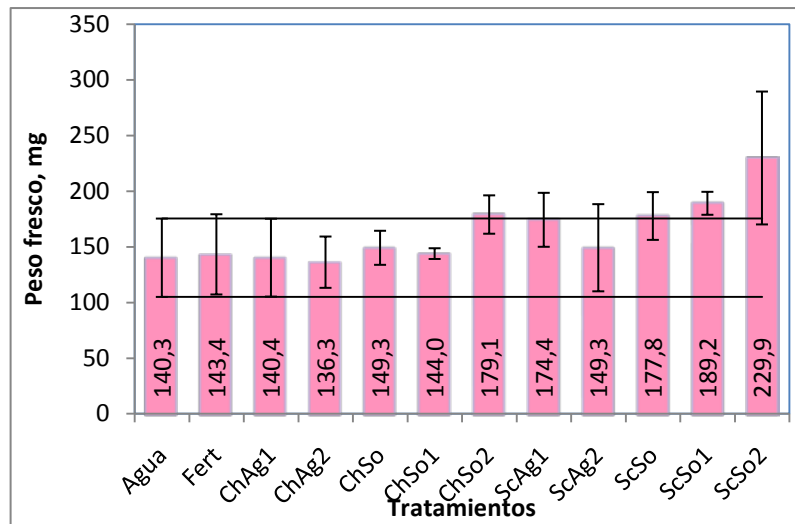
4.2.3 PESO FRESCO DE GERMINADOS

El promedio de las medidas de peso fresco de los germinados de 7 días, se presentan en la Gráfica 12 expresadas en mg, estos datos presentaron diferencias significativas en el ANOVA de un factor realizado con un valor de significancia de 0.05, presentado en el

anexo de este documento. El promedio de las medidas de peso fresco de los germinados de 14 días, se presentan en la Gráfica 13 expresados en mg, el análisis estadístico, en este caso indica que no hubo diferencias significativas entre este grupo de datos.



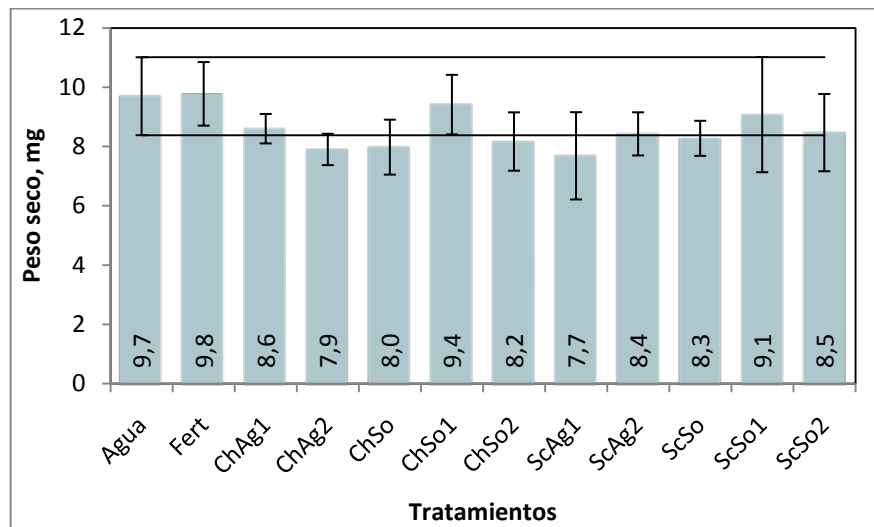
Gráfica 12 Peso fresco promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg



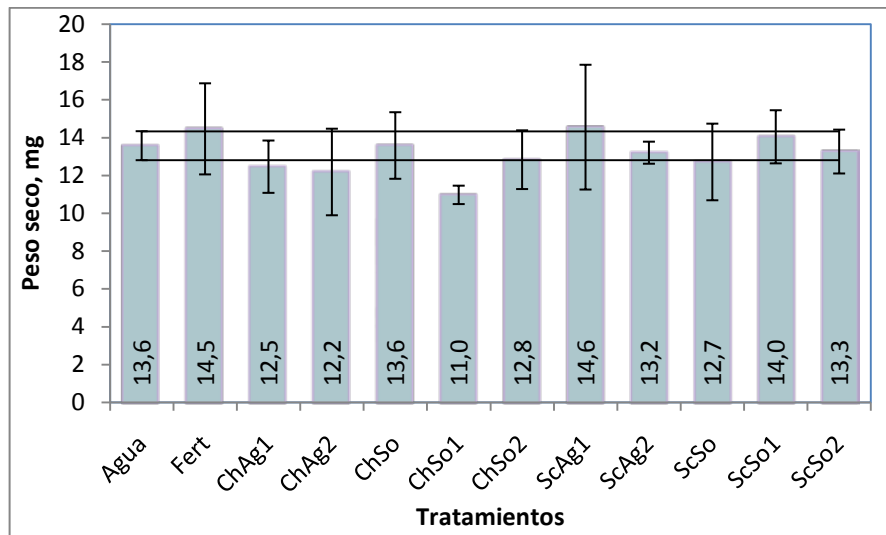
Gráfica 13 Peso fresco promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mg

4.2.4 PESO SECO DE GERMINADOS

Los resultados promedio de las medidas de peso seco de los germinados cultivados con los tratamientos de microalgas se detallan para los germinados de 7 días, en la Gráfica 14, estos datos no presentaron diferencias significativas en el ANOVA de un factor con un valor de significancia de 0.05, presentado en el anexo de este documento. Los datos promedio de las medidas de peso seco para los germinados de 14 días, se presentan en la Gráfica 15 expresada en mg, el análisis estadístico, también indica que no hay diferencias significativas para este grupo de datos.



Gráfica 14 Peso seco promedio de germinados de brócoli de 7 días, expresado en mg



Gráfica 15 Peso seco promedio de germinados de brócoli de 14 días, expresado en mg

4.3 COMPARACIÓN ENTRE TRATAMIENTOS

Se ha observado la posibilidad de incrementar el contenido de algunos compuestos funcionales en germinados de brócoli, mediante su cultivo sobre soluciones de microalgas. A continuación se presentan la Tabla 13 y Tabla 14, que recopilan los resultados del trabajo expresados como un porcentaje frente a los valores del control para el contenido de compuestos funcionales β -caroteno, ácido ascórbico, sulforafane, actividad antioxidante en los germinados de 7 y 14 días respectivamente. De igual manera, se presentan datos comparativos frente al control, de la altura de tallo, longitud de raíz, peso fresco y peso seco de los germinados cultivados en las mismas etapas de 7 y 14 días, en la Tabla 15 y en la Tabla 16.

Tabla 13 Cuadro resumen del contenido de compuestos fitoquímicos de germinados de brócoli de 7 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control

| | Fert | ChAg 1 | ChAg 2 | ChSo | ChSo 1 | ChSo2 | ScAg 1 | ScAg2 | ScSo | ScSo 1 | ScSo2 |
|------------------------|-------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-----------|-------------|
| β -caroteno | (46.29) | 38.50 | (2.73) | (14.91) | 15.73 | 48.18 | (4.93) | 13.28 | (11.64) | (8.18) | (7.68) |
| Actividad antioxidante | 50.82 | 37.46 | 42.09 | 77.85 | 55.10 | 24.19 | 9.76 | 44.56 | 24.68 | 69.81 | 32.17 |
| Ácido ascórbico | (1.53) | (15.86) | 55.46 | 37.52 | (1.14) | (14.31) | 41.89 | (11.05) | 53.19 | (0.80) | (12.22) |

Tabla 14 Cuadro resumen del contenido de compuestos fitoquímicos de germinados de brócoli de 14 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control

| | Fert | ChAg 1 | ChAg 2 | ChSo | ChSo 1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------------------------|------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| β -caroteno | (4.54) | (31.89) | (21.85) | (24.17) | (9.45) | (28.98) | (20.65) | (22.76) | (1.04) | (12.94) | (37.52) |
| Actividad antioxidante | (3.61) | 22.69 | 4.02 | (5.02) | (0.60) | 9.04 | 3.52 | 5.53 | (5.25) | (5.94) | 12.25 |
| Ácido ascórbico | 89.13 | 34.34 | 192.40 | 128.11 | 60.65 | 67.87 | 136.10 | 24.98 | 211.5 5 | 36.91 | 4.13 |
| Sulforafane | 46.33 | 64.15 | 87.80 | 67.42 | 101.31 | (0.05) | 50.47 | 52.98 | 18.76 | (5.96) | (3.84) |

La comparación entre tratamientos en lo que se refiere a la capacidad de los tratamientos con microalgas sobre el contenido de compuestos fitoquímicos funcionales en los germinados de brócoli (Tabla 13 y Tabla 14), se puede observar que ambos tratamientos preparados sobre agua con las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus*, parecen favorecer el incremento del contenido de ácido ascórbico, y la actividad antioxidante para los germinados tanto de 7 como de 14 días, así como el contenido de sulforafane en los germinados de 14 días.

Dado que las dos especies de microalgas son del género *Chlorophytas*, sus metabolismos son también similares, es de esperarse una producción igualmente similar en los metabolitos que secretan, como en el caso de fitohormonas o sustancias promotoras de crecimiento tal y como lo señalaron Molar y Ördög (2005), y Stirk et al. (2002). Estos autores señalan que las sustancias nutritivas que poseen las microalgas y que secretan al medio de cultivo favorecen y facilitan los mecanismos metabólicos de las plantas, puesto que las mismas tendrían estas sustancias directamente disponibles para su utilización y asimilación como se evidenció en el estudio por Faheed y Abd-El Fattah (2008), en lechuga. Como se pudo observar en la Tabla 9 sobre la composición aproximada de la biomasa de *Chlorella* y *Scenedesmus* y en la Tabla 10 sobre la composición de los aminoácidos presentes en la proteína microalgal de estas dos especies, la composición de la biomasa de estas microalgas es muy similar, podría ser por ello, que no se observaron grandes diferencias en la respuesta de los germinados ante los diferentes tratamientos.

Tabla 15 Cuadro resumen de medidas de crecimiento en germinados de brócoli de 7 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control

| | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Altura de tallo | (1.75) | (14.17) | (31.62) | 27.98 | (14.05) | 31.67 | 16.14 | (32.68) | 31.64 | (3.61) | (3.91) |
| Longitud de Raíz | (49.98) | (44.72) | (37.39) | (45.63) | (42.87) | (35.88) | (44.10) | (32.52) | 13.03 | (47.77) | (17.29) |
| Peso fresco | (12.36) | (25.11) | (5.41) | (24.00) | (7.44) | (0.19) | 16.51 | (12.46) | (6.68) | 23.11 | 70.16 |
| Peso seco | 0.83 | (11.29) | (18.51) | (17.72) | (2.91) | (15.76) | (20.73) | (13.10) | (14.65) | (6.40) | (12.66) |

Tabla 16 Cuadro resumen de medidas de crecimiento en germinados de brócoli de 14 días tratados con soluciones de microalgas respecto al tratamiento control (agua) expresado como %. Valores entre paréntesis corresponden a medidas menores que las del control

| | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|---------|
| Altura de tallo | 13.28 | (8.68) | (38.03) | 27.05 | 22.73 | 48.12 | 17.84 | (24.82) | 67.84 | 16.96 | 2.28 |
| Longitud de raíz | (24.97) | (37.85) | (41.53) | (33.61) | (39.12) | (35.75) | (26.34) | (55.28) | 3.87 | (53.88) | (30.26) |
| Peso fresco | 2.17 | 0.04 | (2.84) | 6.36 | 2.64 | 27.66 | 24.29 | 6.41 | 26.72 | 34.86 | 63.86 |
| Peso seco | 6.56 | (8.18) | (10.24) | 0.07 | (19.16) | (5.45) | 7.22 | (2.73) | (6.34) | 3.46 | (2.28) |

En lo que respecta a las medidas de crecimiento de los germinados, podría discutirse que el efecto de los tratamientos aplicados se vería evidenciado en etapas posteriores. En la etapa de 7 días, no se observó casi ningún efecto positivo, incluyendo los resultados del fertilizante comercial, pero a los 14 días se comenzaron a observar algunas respuestas positivas, lo que podría indicar que en etapas de crecimiento futuras, estas aplicaciones de microalgas podrían mejorar estos indicadores de crecimiento.

Cabe destacar, que aunque la mayoría de las medidas aparecen como menores al control, la mayoría, exceptuando el caso de la longitud de las raíces, no corresponden a diferencias significativas frente al tratamiento control (agua), lo que indicaría, que no se presenta un efecto inhibitor del crecimiento.

En lo que respecta a los últimos resultados referentes a las medidas de crecimiento, puede observarse que los tratamientos con los sobrenadantes sin células de ambas microalgas (ChSo y ScSo) fueron los que más favorecieron las medidas de longitud de tallo y peso fresco, pero entre las dos microalgas, la especie *Scenedesmus*, muestra mayores propiedades promotoras de crecimiento.

4.4 IMPACTOS DEL PROYECTO Y PROPUESTAS A FUTURO

Los germinados de brócoli constituyen una fuente rica de nutrientes y compuestos fitoquímicos funcionales, el consumo prácticamente inexistente de este tipo de productos en Colombia, no debe considerarse una limitante para el desarrollo del mercado de germinados de esta y otras variedades de Brassicaceae. Los hábitos alimentarios de una población pueden variar según tendencias mundiales y en la medida que los consumidores tengan mayor y mejor acceso a información sobre los beneficios del consumo de determinados productos.

Los germinados se consumen normalmente en porciones más pequeñas que las inflorescencias de brócoli, suministrando un mayor contenido de nutrientes en volúmenes menores, por ello se consideran como alimentos nutricionalmente densos. En Europa, Asia y Norte América se consumen comúnmente en ensaladas y sandwiches, y en estos mercados, se están iniciando pruebas clínicas sobre encapsulados de germinados de brócoli liofilizados como fuente de sulforafane, indicando un potencial mercado para estos cultivos. El mercado de estos cultivos podría ser interno bien sea para el consumo directo por el consumidor en su estado fresco, como ingrediente o como insumo para la industria de suplementos alimentarios y nutraceuticos, o podría encontrarse un nuevo nicho de mercado como producto de exportación, dadas las limitaciones que impone una patente para el cultivo de germinados de brócoli en Estados Unidos.

Como propuesta para investigaciones futuras, y con base en que se han encontrado varias referencias sobre la relación entre la iluminación y el contenido de ácido ascórbico en germinados de brócoli, podría ser interesante combinar un estudio de producción hidropónico de germinados de brócoli con cultivos de microalgas bajo diferentes intensidades de luz en un sistema integrado. Otra variante interesante a la continuidad de la investigación, sería evaluar la capacidad antimicrobiana que poseen estas microalgas para mejorar la calidad fitosanitaria de estos germinados, puesto que generalmente se consumen crudos, y existe preocupación sobre su posible carga microbiana y los riesgos que dicha contaminación pudiesen presentar a la salud del consumidor.

De igual manera, y siguiendo con la línea de investigación de este proyecto, se considera que sería interesante ampliar estas evaluaciones a otras especies vegetales para corroborar estos resultados, así como ampliar el espectro de análisis a evaluar en la materia vegetal, como el contenido de minerales de importancia nutricional como el hierro y el zinc, así como el efecto sobre la vitamina A y el ácido fólico.

Aunque para el caso particular del brócoli, la altura del germinado no es una característica de especial interés, tres tratamientos presentaron una tendencia hacia la promoción de la altura de los germinados de brócoli tanto en tratamientos evaluados a los 7 días como a los 14 días (ChSo, ChSo2 y ScSo, indicando la posibilidad de utilizar soluciones de microalgas para mejorar cultivos donde la longitud de tallos sea de importancia productiva, como por ejemplo, en cultivos de cebolla de rama (*Allium wakegi*), espárragos (*Asparagus officinalis*), apio o celery (*Apium graveolens*), entre otros, podría inclusive ser interesante su aplicación en cultivos no alimenticios como en rosas, donde se desean obtener flores de tallos cada vez más largos.

5. CONCLUSIONES

Los extractos de microalgas han mostrado en estudios realizados por otros autores, poseer un potencial como biofertilizante, incrementando la productividad de los cultivos evaluados. En este trabajo se buscaba evaluar el efecto del empleo de soluciones de microalgas sobre el contenido de los compuestos funcionales ácido ascórbico, β -caroteno, sulforafane, y la actividad antioxidante, en germinados de brócoli, y determinar la potencialidad de las diferentes soluciones de microalgas empleadas como agentes promotores de dichos compuestos funcionales.

Se encontró que los tratamientos evaluados con microalgas tienen la potencialidad de favorecer la concentración de ácido ascórbico y sulforafane en el tejido vegetal.

Cuatro tratamientos (ChAg2, ChSo, ScAg1 y ScSo) promovieron un incremento en el contenido de ácido ascórbico respecto al control en ambas evaluaciones (7 y 14 días).

Siete de los diez tratamientos con microalgas evaluados, promovieron un incremento significativo en el contenido de sulforafane respecto al tratamiento control. Y en el caso particular del tratamiento con ChSo1 se obtuvo un incremento de hasta un 100% respecto a germinados cultivados solamente con agua, indicando que es un tratamiento con potencialidad para el enriquecimiento de los germinados con este fitoquímico.

También, se pudo observar que tres tratamientos promovieron un incremento simultáneo en tres de los aspectos funcionales evaluados en los germinados, estos tratamientos fueron ChAg1, ChAg2, y ChSo, mientras que otros tres tratamientos promovieron un incremento en dos de los contenidos funcionales evaluados, estos tratamientos fueron ChSo1, ScAg1 y ScAg2.

Tres tratamientos mostraron una tendencia hacia la promoción de la altura de los germinados de brócoli tanto en tratamientos evaluados a los 7 días como a los 14 días (ChSo, ChSo2 y ScSo). En lo que respecta a peso de los germinados, solo uno de los tratamientos presentó una respuesta significativamente superior a las demás (ScSo2).

Se apreció la posibilidad de emplear microalgas en la forma de soluciones de tratamiento para incrementar el contenido de compuestos funcionales en germinados de brócoli. De entre los tratamientos empleados se distinguen ChSo, ChSo1 y ScAg1 como tratamientos que presentaron un efecto de promoción en el contenido de compuestos funcionales, pero se recomienda continuar con nuevas pruebas experimentales para corroborar estos resultados y evaluar el efecto sobre otros micronutrientes y compuestos funcionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd el Moniem, E. A., y Abd-Allah, A. S. E. (2008). "Effect of Green Alga cells Extract as foliar spray on vegetative growth, yield and berries quality of Superior Grapevines." *American- Eurasian J. Agric. & Envirom. Sci.*, 4, 427-433.
- Abd el Moniem, E. A., Adb-Allah, A. S. E., y Ahmed, M. A. (2008). "The combined effect of some organic manures, mineral N fertilizers and algal cells extract on yield and fruit quality of williams Banana plants." *American-Eurasian j. Agric. & Environ. Sci.*, 4, 417-426.
- Aires, A., Rosa, E., y Carvalho, R. (2006). "Effect of nitrogen and sulfur fertilization on glucosinolates in the leaves and roots of broccoli sprouts (*Brassica oleracea* var. *italica*)." *J Sci Food Agric*, 86, 1512-1516.
- Avagyan, A. B. (2008). "A contribution to global sustainable development: inclusion of microalgae and their biomass in production and bio cycles." *Clean Techn Environ Policy*, 10, 313-317.
- Azuma, K., Ippoushi, K., Ito, H., Higashio, H., y Terao, J. (1999). "Evaluation of antioxidative activity of vegetable extracts in linoleic acid emulsion and phospholipid bilayers." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(2010-2016).
- Azzi, A., Davies, K. J. A., y Kelly, F. (2004). "Free radical biology - terminology and critical thinking." *FEBS Lett*, 558, 3-6.
- Becker, E. W. (2007). "Micro-algae as a source of protein." *Biotechnology Advances*, 25, 207-210.
- Bellostas, N., Kachlicki, P., Sorensen, J. C., y Sorensen, H. (2007). "Glucosinolate profiling of seeds and sprouts of *B. oleracea* varieties used for food." *Scientia Horticulturae*, 114, 234-242.
- Bones, A. M., y Rossiter, J. T. (1996). "The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry." *Physiologia Plantarum*, 97, 194-208.
- Burmeister, W. P., Cottaz, S., Rollin, P., Vasella, A., y Henrissat, B. (2000). "High resolution X-Ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. ." *Journal of Biological Chemistry*, 275, 39385-39393.
- Burns, S. (2010). "Is your produce losing health power?" *Prevention*, 50-53.
- Cao, G., Sofic, E., y Prior, R. L. (1996). "Antioxidant capacity of tea and common vegetables." *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 3426-3431.
- Ciska, E., Martyniak-Przbyzewska, B., y Kozłowski, H. (2000). "Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions." *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2862-2867.
- De Pascale, S., Maggio, A., Pernice, R., Fogliano, V., y Barbieri, G. (2007). "Sulphur fertilization may improve the nutritional value of *Brassica rapa* L. Subsp. *Sylvestris*." *Europ. J. Agronomy*, 26, 418-424.
- Faheed, F. A., y Abd-El Fattah, Z. (2008). "Effect of *Chlorella vulgaris* as Bio-fertilizer on Growth parameters and metabolic aspects of lettuce plant." *Journal of agriculture & social sciences*, 165-169.
- Fahey, J. W., y Talalay, P. (1998). "Method of preparing a food product from cruciferous seeds." www.brassica.com, U. S. P. Office, ed., Johns Hopkins School of Medicine, United States.
- Fahey, J. W., Zhang, Y., y Talalay, P. (1997). "Broccoli sprouts: an exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 10367-10372.
- Farnham, M. W., Wilson, P. E., Stephenson, K. K., y Fahey, J. W. (2004). "Genetic and environmental effects on glucosinolate content and chemoprotective potency of broccoli." *Plant Breed*, 123, 60-65.

- Halliday, J. (2010a). "Health claims could impact natural perception." *Financial & Industry*, www.food-navigator.com.
- Halliday, J. (2010b). "Nutrient profiles reinstated in EU Parliament vote – just." nutrition labeling, www.food-navigator.com.
- Halliday, J. (2010c). "Research investigates what consumers see as 'natural'." *Financial & industry*, www.food-navigator.com.
- Halliwell, B. (1995). "Antioxidant characterization. Methodology and mechanism." *Ciochem Pharmacol*, 49, 1341-1348.
- Hancock, R. D., y Viola, R. (2005). "Improving the nutritional value of crops trough enhancement of L-ascorbic acid (Vitamin C) content: Rationale and Biotechnological opportunities." *J. Agric. Food Chem.*, 53(5248-5257).
- Hanna, H., El-Baky, A., Hussien, M. M., y Game S., E.-B. (2008). "Algal extracts improve antioxidant defense abilities and salt tolerance of wheat plant irrigated with sea water." *African Journal of Biochemistry Research*, 2(7), 151-164.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vinvieri, F. F., y Romani, A. (2006). "Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties." *Food Chemistry*, 99, 464-469.
- Instituto Nacional de Salud, S. d. E. y. U. (2001). "Estimaciones de población por sexo y zona según departamentos de Colombia."
- Jeffery, E. H., Brown, A., Kurilich, A. C., Keck, A. S., Matusheski, N., Klein, B. P., y Juvik, J. A. (2003). "Variation in content of bioactive components in broccoli." *J Food Compost Anal*, 16, 323-330.
- Keck, A. S., Qiao, Q., y Jeffery, E. H. (2003). "Food matrix effects on bioactivity of broccoli-derived sulforaphane in liver and colon of F344 rats." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3320-3327.
- Kim, S. J., Matsuo, T., y Watanabe, Y. (2001). "Effect of nitrogen and sulphur application on the glucosinolate content in vegetable turnip rape (*Brassica rapa* L.)." *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 48, 43-49.
- Kurilich, A. C., Jeffery, E. H., Juvik, J. A., Wallig, M. A., y Klein, B. P. (2002). "Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay." *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 5053-5057.
- Kurilich, A. C., Tsau, G. J., Brown, A., Howard, L., Klein, B. P., Jeffery, E. H., Kushad, M., y Wallig, J. A. (1999). "Carotene, tocoferol and ascorbate contents in subspecies of *brassica oleracea*." *J. Agric. Food Chem.*, 47(4), 1576-1581.
- Li, X., y Kushad, M. M. (2005). "Purification and characterization of myrosinase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots." *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(6), 503-511.
- Liang, H., Yuan, Q., y Xiao, Q. (2005). "Purification of sulforaphane from *Brassica oleracea* seed meal using low-pressure column chromatography." *Journal of Chromatography B*, 828, 91-96.
- Liang, H., Yuan, Q. P., Dong, H. R., y Liu, Y. M. (2006). "Determination of sulforaphane in broccoli and cabbage by high-performance liquid chromatography." *Journal of food Composition and Analysis* 19, 473-476.
- Lin, C.-H., y Chang, C.-Y. (2005). "Textural change and antioxidant properties of broccoli under different cooking treatments." *Food Chemistry*, 90, 9-15.
- Lisiewska, Z., y Kmiecik, W. (1996). "Effects of level of nitrogen fertilizer, processing conditions and period of storage of frozen broccoli and cauliflower on vitamin C retention." *Food Chemistry*, 57(2), 267-270.

- Martínez-Ballesta, M. C., López-Pérez, L., Hernández, M., López-Berenguer, C., Nieves, F.-G., y Carvajal, M. (2008). "Agricultural practices for enhanced human health." *Phytochem Rev.*, 7, 251-260.
- Martínez-Sánchez, A., Gil-Izquierdo, Á., Gil, M. I., y Ferreres, F. (2008). "A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C, and antioxidant properties of baby leaf *Brassicaceae* species." *J. Agric. Food Chem.*, 56(7), 2330-2340.
- Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., Gulewicz, P., Gulewicz, K., y Vidal-Valverde, C. (2008). "Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts." *Food and Chemical Toxicology*, 46, 1635-1644.
- Matkowski, A. (2008). "Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A review." *Biotechnology Advances*, 26, 548-560.
- Matusheski, N. V., y Jeffery, E. H. (2001). "Comparison of the bioactivity of two glucoraphanin hydrolysis products found in broccoli, sulforaphane and sulforaphane nitrile." *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5743-5749.
- Meyer, M., y Adam, S. T. (2008). "Comparison of glucosinolate levels in commercial broccoli and red cabbage from conventional and ecological farming." *Eur. Food Res. Technol.*, 226, 1429-1437.
- Ministerio de la Protección Social, R. d. C. (2003). "Un panorama nacional de la salud y enfermedad mental en Colombia: Informe preliminar."
- Molnar, Z., y Ördög, V. (2005). "Microalgal and cyanobacterial extracts in the tissue culture of higher plants (pea, tobacco, beet)." *Acta Biologica Szegediensis*, 49(1-2), 39-40.
- Molyneux, P. (2004). "The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity." *Songklanakarin J Sci Technol*, 26, 211-219.
- Moreno, D. A., Carvajal, M., Lopez-Berenguer, C., y Garcia-Viguera, C. (2006). "Chemical and biological characterization of nutraceutical compounds of broccoli." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41, 1508-1522.
- Nakagawa, K., Umeda, T., Higuchi, O., Tsuzuki, T., Suzuki, T., y Miyazawa, T. (2006). "Evaporative Light-Scattering Analysis of Sulforaphane in Broccoli Samples: Quality of Broccoli Products Regarding Sulforaphane Contents." *J. Agric. Food Chem.*, 54, 2479-2483.
- Nautiy, A., Shekhar, C., Govindarajan, R., Lavania, M., y Pushpangadan, P. (2008). "Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: Involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488." *J. Agric. Food Chem.*, 56, 4474-4481.
- Ochoa Jaramillo, F. L., y Montoya Vélez, L. P. (2004). "Mortalidad por cáncer en Colombia 2001." *Revista CES MEDICINA*, 18(2), 19-36.
- Pérez-Balibrea, S., Moreno, D. A., y García-Viguera, C. (2008). "Influence of light on health-promoting phytochemicals of broccoli sprouts." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 904-910.
- Podsedek, A. (2007). "Natural antioxidants and antioxidant capacity of brassica vegetables: A Review." *LWT*, 40, 1-11.
- Prieto, P., Pineda, M., y Aguilar, M. (1999). "Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E." *Anal Biochem*, 269, 337-341.
- Puupponen-Pimia, R., Hakkinen, S. T., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A. M., y Euroala, M. (2003). "Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(1389-1402).
- Raja, R., Hemaiswaryz, S., Ashok Kumar, N., Sridhar, S., y Rengasamy, R. (2008). "A perspective on the biotechnological potential of microalgae." *Critical Reviews in Microbiology*, 34, 77-88.

- Rangkadilok, N., Nicolas, M. E., Bennett, R. N., Premier, R. R., Eagling, D. R., y Taylor, P. W. J. (2002). "Developmental changes of sinigrin and glucoraphanin in three Brassica species (Brassica nigra, Brassica juncea and Brassica oleracea var. italica)." *Scientia Horticulturae*, 96, 11–26.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay." *Free Radic Biol Med*, 26, 1231-1237.
- Rosa, E. A., Heaney, R. K., Portas, C. A., y Roger, G. (1996). "Changes in glucosinolate concentrations in Brassica crops (B. oleracea and B. napus) throughout growing seasons." *J. Sci. Food Agric.*, 71, 237-244.
- Sarikamis, G., Marquez, J., MacCormack, R., Bennett, R. N., Roberts, J., y Mithen, R. (2006). "High glucosinolate broccoli: a delivery system for sulforaphane." *Mol Breeding*(18), 219-228.
- Schonfof, I., Kläring, H.-P., Krumbein, A., Clauben, W., y Schreiner, M. (2007). "Effect of temperature increase under low radiation conditions on phytochemicals and ascorbic acid in greenhouse grown broccoli." *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 119, 103-111.
- Schreiner, M. (2005). "Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals." *Eur. J. Nutr.* , 44, 85-94.
- Scott-Thomas, C. (2010). "Childhood obesity task force outlines areas for action." Financial and Industry, Food-navigator.com.
- Shaaban, M. M. (2001a). "Green microalgae water extract as foliar feeding to wheat plants." *pakistan journal of Biological Sciences*, 4(6), 628-632.
- Shaaban, M. M. (2001b). "Nutritional status and growth of maize plants as affected by green microalgae as soil additives." *OnLine journal of Biological Sciences*, 1(6), 475-479.
- Shahidi, F. (2004). "Functional foods: their role in health promotion and disease prevention." *Journal of Food Science*, 69(5), 146-149.
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., y Talalay, P. (2001). "Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 501-508.
- Singh, J., Upadhyay, A. K., Prasad, K., Bahadur, A., y Rai, M. (2007). "Variability of carotenes, vitamin C, E and phenolics in Brassica vegetables." *Journal of food composition and Analysis* 20, 106-112.
- Sivakumar, G., Aliboni, A., y Bacchetta, L. (2007). "HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species." *Food Chemistry*, 104, 1761–1764.
- Stirk, W. A., Ördög, V., Van Staden, J., y K., J. (2002). "Cytokinin- and auxin-like activity in cyanophyta and microalgae." *Journal of Applied phycology* 14, 215-221.
- The University of Queensland, A. (2009). "UQ researcher offers a greater incentive to eat your greens." UQ news.
- TS. (2001). "Patent sprouts controversy." *Trends in Plant Science*, 6(10), 452.
- Valente Pereira, F. M., Rosa, E., Fahey, J. W., Stephenson, K. K., Carvalho, R., y Aires, A. (2002). "Influence of Temperature and Ontogeny on the Levels of Glucosinolates in Broccoli (Brassica oleracea Var. italica) Sprouts and Their Effect on the Induction of Mammalian Phase 2 Enzymes." *J. Agric. Food Chem.*, 50(21), 6239-6244.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., y Prior, R. L. (2004). "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States." *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52(4026-4037).
- Zhang, D., y Hamauzu, Y. (2004). "Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking." *Food Chemistry*, 88, 503-509.

Zhao, F., Evans, E., Bilsborrow, P., y Syers, J. K. (1994). "Influence of nitrogen and sulphur on the glucosinolate profile of rapeseed (*Brassica napus* L.) " *J. Sci. Food Agric.*, 64, 295-304.

ANEXOS

ANEXO 1- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS

ANEXO 1.1- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS SOBRE CONTENIDOS DE COMPUESTOS FUNCIONALES EN GERMINADOS DE BRÓCOLI.

ANEXO 1.1.1- DATOS SOBRE CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla 17 Actividad antioxidante de germinados de 7 días, expresado como % de capacidad reductora de DPPH.

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg 1 | ChAg 2 | ChSo | ChSo 1 | ChSo 2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| R1 | 22.67 2 | 24.483 | 23.793 | 24.569 | 30.948 | 28.966 | 21.466 | 18.793 | 27.500 | 20.086 | 28.103 | 23.793 |
| R2 | 15.36 2 | 27.819 | 24.422 | 25.293 | 31.569 | 26.474 | 22.086 | 21.293 | 23.853 | 23.069 | 30.629 | 22.578 |
| R3 | 14.70 7 | 27.241 | 24.284 | 25.078 | 31.284 | 26.362 | 21.948 | 17.802 | 24.888 | 22.603 | 30.828 | 23.336 |
| Prom | 17.58 | 26.51 | 24.17 | 24.98 | 31.27 | 27.27 | 21.83 | 19.30 | 25.41 | 21.92 | 29.85 | 23.24 |
| SD | 4.422 | 1.783 | 0.331 | 0.372 | 0.311 | 1.472 | 0.326 | 1.799 | 1.879 | 1.605 | 1.519 | 0.614 |

Tabla 18 Actividad antioxidante de germinados de 14 días, expresado como % de capacidad reductora de DPPH

| | Agua | Fert | ChAg 1 | ChAg 2 | ChSo | ChSo 1 | ChSo 2 | ScAg 1 | ScAg 2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| R1 | 25.32 4 | 22.73 8 | 29.414 | 27.993 | 24.64 8 | 28.04 8 | 30.83 4 | 18.62 1 | 30.69 0 | 24.34 5 | 22.46 2 | 28.26 9 |
| R2 | 34.00 1 | 32.28 7 | 38.400 | 35.956 | 33.89 8 | 36.52 3 | 39.52 8 | 36.34 8 | 36.69 8 | 33.82 0 | 33.36 7 | 34.07 3 |
| R3 | 26.04 3 | 28.25 9 | 35.147 | 29.578 | 30.28 4 | 24.51 7 | 30.31 9 | 30.42 2 | 27.87 1 | 29.44 0 | 26.01 7 | 31.39 7 |
| R4 | 34.57 8 | 30.39 7 | 41.698 | 29.767 | 31.34 5 | 39.87 1 | 35.75 9 | 31.78 4 | 26.96 6 | 26.20 7 | 33.37 9 | 36.75 9 |
| R5 | 39.09 5 | 39.62 1 | 50.466 | 42.147 | 30.88 8 | 29.12 9 | 36.97 4 | 47.46 6 | 45.61 2 | 36.87 9 | 34.36 2 | 48.02 6 |
| Pro m | 31.81 | 30.66 | 39.02 | 33.09 | 30.21 | 31.62 | 34.68 | 32.93 | 33.57 | 30.14 | 29.92 | 35.70 |
| SD | 5.934 | 6.155 | 7.840 | 5.907 | 3.402 | 6.355 | 3.992 | 10.43 2 | 7.733 | 5.208 | 5.349 | 7.574 |

ANEXO 1.1.2 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE B-CAROTENO

Tabla 19 Datos sobre el contenido de B-carotenos en germinados de 7 días expresado en mg.L⁻¹

| Prueba | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R1 | 0.835 | 0.409 | 1.042 | 0.732 | 0.645 | 0.836 | 1.076 | 0.715 | 0.829 | 0.729 | 0.640 | 0.621 |
| R2 | 0.682 | 0.370 | 0.952 | 0.679 | 0.593 | 0.883 | 1.115 | 0.667 | 0.848 | 0.616 | 0.654 | 0.701 |
| R3 | 0.654 | 0.388 | 1.014 | 0.701 | 0.610 | 0.794 | 1.027 | 0.682 | 0.784 | 0.573 | 0.700 | 0.682 |

Tabla 20 Datos sobre contenido de b-carotenos en germinados de 14 días expresado en mg.L⁻¹

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R1 | 1.082 | 1.084 | 0.760 | 1.021 | 0.925 | 0.806 | 0.919 | 0.971 | 1.014 | 1.000 | 0.999 | 0.839 |
| R2 | 0.968 | 0.821 | 0.694 | 0.711 | 0.588 | 1.014 | 0.518 | 0.548 | 0.467 | 1.087 | 0.692 | 0.439 |
| R3 | 0.971 | 0.752 | 0.539 | 0.553 | 0.468 | 0.870 | 0.539 | 0.784 | 0.771 | 0.793 | 0.795 | 0.456 |
| R4 | 1.023 | 1.164 | 0.729 | 0.864 | 1.033 | 0.911 | 0.897 | 0.949 | 0.939 | 1.042 | 1.037 | 0.799 |
| R5 | 0.995 | 0.991 | 0.710 | 0.790 | 0.808 | 0.963 | 0.706 | 0.748 | 0.701 | 1.065 | 0.864 | 0.617 |

Tabla 21 Contenido de b-carotenos en germinados de 7 días, expresados en mg/100g PF

| | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| R1 | 0.334 | 0.164 | 0.417 | 0.293 | 0.258 | 0.334 | 0.430 | 0.286 | 0.331 | 0.292 | 0.256 | 0.249 |
| R2 | 0.273 | 0.148 | 0.381 | 0.272 | 0.237 | 0.353 | 0.446 | 0.267 | 0.339 | 0.247 | 0.262 | 0.280 |
| R3 | 0.262 | 0.155 | 0.406 | 0.280 | 0.244 | 0.318 | 0.411 | 0.273 | 0.313 | 0.229 | 0.280 | 0.273 |
| Prom | 0.290 | 0.156 | 0.401 | 0.282 | 0.246 | 0.335 | 0.429 | 0.275 | 0.328 | 0.256 | 0.266 | 0.267 |
| ST | 0.039 | 0.008 | 0.018 | 0.011 | 0.011 | 0.018 | 0.018 | 0.010 | 0.013 | 0.032 | 0.012 | 0.017 |

Tabla 22 Contenido de β-Caroteno en germinados de 14 días expresado en mg/100g PF.

| | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| R1 | 0.433 | 0.434 | 0.304 | 0.408 | 0.370 | 0.322 | 0.368 | 0.389 | 0.406 | 0.400 | 0.400 | 0.336 |
| R2 | 0.387 | 0.328 | 0.278 | 0.284 | 0.235 | 0.406 | 0.207 | 0.219 | 0.187 | 0.435 | 0.277 | 0.176 |
| R3 | 0.389 | 0.301 | 0.216 | 0.221 | 0.187 | 0.348 | 0.216 | 0.313 | 0.309 | 0.317 | 0.318 | 0.182 |
| R4 | 0.409 | 0.465 | 0.292 | 0.346 | 0.413 | 0.364 | 0.359 | 0.379 | 0.376 | 0.417 | 0.415 | 0.320 |
| R5 | 0.398 | 0.396 | 0.284 | 0.316 | 0.323 | 0.385 | 0.282 | 0.299 | 0.280 | 0.426 | 0.346 | 0.247 |
| Prom | 0.403 | 0.385 | 0.275 | 0.315 | 0.306 | 0.365 | 0.286 | 0.320 | 0.311 | 0.399 | 0.351 | 0.252 |
| ST | 0.019 | 0.069 | 0.034 | 0.070 | 0.094 | 0.032 | 0.076 | 0.069 | 0.086 | 0.048 | 0.057 | 0.075 |

ANEXO 1.1.3 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Tabla 23 Datos sobre contenido de ácido ascórbico de germinados de 7 días, expresado como mg.L⁻¹

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R1 | 28.467 | 29.357 | 25.338 | 45.261 | 37.380 | 29.786 | 21.856 | 39.902 | 26.884 | 41.520 | 28.896 | 24.108 |
| R2 | 26.534 | 27.514 | 22.157 | 42.650 | 38.623 | 25.968 | 25.641 | 42.981 | 23.357 | 42.698 | 27.008 | 22.510 |
| R3 | 29.562 | 26.397 | 23.657 | 43.550 | 40.284 | 27.842 | 24.964 | 37.105 | 24.980 | 45.327 | 27.980 | 27.608 |

Tabla 24 Contenido de ácido ascórbico de germinados de 14 días, expresado como mg.L⁻¹

| | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R1 | 16.265 | 46.730 | 32.440 | 69.855 | 60.300 | 33.295 | 37.795 | 51.535 | 29.410 | 78.870 | 33.630 | 23.385 |
| R2 | 22.320 | 40.970 | 29.550 | 68.915 | 54.155 | 37.680 | 38.170 | 54.295 | 31.360 | 69.755 | 32.620 | 19.370 |
| R3 | 30.470 | 42.905 | 30.780 | 63.145 | 43.065 | 39.960 | 39.960 | 57.210 | 25.535 | 66.515 | 28.295 | 29.155 |

Tabla 25 Contenido de ácido ascórbico en germinados de 7 días, expresado como mg/100g PF

| Tratamientos | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| R1 | 11.387 | 11.743 | 10.135 | 18.104 | 14.952 | 11.914 | 8.742 | 15.961 | 10.754 | 16.608 | 11.558 | 9.643 |
| R2 | 10.614 | 11.006 | 8.863 | 17.060 | 15.449 | 10.387 | 10.256 | 17.192 | 9.343 | 17.079 | 10.803 | 9.004 |
| R3 | 11.825 | 10.559 | 9.463 | 17.420 | 16.114 | 11.137 | 9.986 | 14.842 | 9.992 | 18.131 | 11.192 | 11.043 |
| Prom | 11.28 | 11.10 | 9.49 | 17.53 | 15.50 | 11.15 | 9.66 | 16.00 | 10.03 | 17.27 | 11.18 | 9.90 |
| SD | 0.613 | 0.598 | 0.637 | 0.531 | 0.583 | 0.764 | 0.807 | 1.176 | 0.706 | 0.780 | 0.378 | 1.043 |

Tabla 26 Contenido de ácido ascórbico en germinados de 14 días expresado en mg/100g PF.

| | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| R1 | 6.506 | 18.69 2 | 12.97 6 | 27.94 2 | 24.12 0 | 13.31 8 | 15.11 8 | 20.61 4 | 11.76 4 | 31.54 8 | 13.45 2 | 9.354 |
| R2 | 8.928 | 16.38 8 | 11.82 0 | 27.56 6 | 21.66 2 | 15.07 2 | 15.26 8 | 21.71 8 | 12.54 4 | 27.90 2 | 13.04 8 | 7.748 |
| R3 | 12.18 8 | 17.16 2 | 12.31 2 | 25.25 8 | 17.22 6 | 15.98 4 | 15.98 4 | 22.88 4 | 10.21 4 | 26.60 6 | 11.31 8 | 11.66 2 |
| Pro m | 9.21 | 17.41 | 12.37 | 26.92 | 21.00 | 14.79 | 15.46 | 21.74 | 11.51 | 28.69 | 12.61 | 9.59 |
| SD | 2.851 | 1.172 | 0.580 | 1.453 | 3.494 | 1.355 | 0.463 | 1.135 | 1.186 | 2.562 | 1.134 | 1.967 |

ANEXO 1.1.4 - DATOS SOBRE CONTENIDO DE SULFORAFANE

Tabla 27 Efecto de la aplicación de extractos de microalgas sobre el contenido de sulforafane ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) en germinados de brócoli a los 14 días de sembrados

| Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 43.417 | 67.870 | 82.734 | 89.242 | 67.075 | 82.359 | 43.031 | 61.042 | 67.454 | 42.859 | 46.897 | 46.294 |
| 43.005 | 63.650 | 60.445 | 80.060 | 80.380 | 96.188 | 44.173 | 74.716 | 69.520 | 61.189 | 38.507 | 40.475 |
| 47.577 | 64.558 | 76.780 | 82.348 | 76.890 | 91.201 | 46.729 | 65.870 | 68.014 | 55.093 | 40.616 | 42.091 |

Tabla 28 Contenido de sulforafane en germinados de 14 días (mg.mg^{-1} PS)

| | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| R1 | 0.87 | 1.36 | 1.65 | 1.78 | 1.34 | 1.65 | 0.86 | 1.22 | 1.35 | 0.86 | 0.94 | 0.93 |
| R2 | 0.86 | 1.27 | 1.21 | 1.60 | 1.61 | 1.92 | 0.88 | 1.49 | 1.39 | 1.22 | 0.77 | 0.81 |
| R3 | 0.95 | 1.29 | 1.54 | 1.65 | 1.54 | 1.82 | 0.93 | 1.32 | 1.36 | 1.10 | 0.81 | 0.84 |
| AV | 0.89 | 1.31 | 1.47 | 1.68 | 1.50 | 1.80 | 0.89 | 1.34 | 1.37 | 1.06 | 0.84 | 0.86 |
| ST | 0.051 | 0.044 | 0.231 | 0.096 | 0.138 | 0.140 | 0.038 | 0.139 | 0.021 | 0.187 | 0.087 | 0.060 |

ANEXO 1.2- TABLAS DE DATOS RECOPIADOS SOBRE ASPECTOS DE CRECIMIENTO EN GERMINADOS DE BRÓCOLI.

ANEXO 1.2.1 - DATOS SOBRE ALTURA DE GERMINADOS

Tabla 29 Datos sobre Altura de germinados de 7 días, expresado en mm

| Tratamientos | Agua | Fert | ChAg ₁ | ChAg ₂ | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|--------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| R1 | 27.210 | 28.397 | 23.343 | 16.940 | 39.653 | 27.580 | 35.603 | 39.397 | 18.077 | 38.933 | 27.127 | 29.853 |
| R2 | 31.557 | 30.990 | 27.510 | 20.070 | 39.163 | 23.790 | 40.727 | 30.797 | 20.030 | 40.620 | 24.837 | 27.393 |
| R3 | 28.070 | 29.067 | 24.593 | 20.160 | 34.887 | 21.403 | 36.903 | 31.403 | 18.660 | 38.413 | 29.280 | 27.553 |
| R4 | 32.110 | 28.417 | 26.640 | 24.160 | 38.527 | 29.460 | 43.387 | 36.543 | 23.313 | 38.617 | 33.407 | 29.493 |
| Prom | 29.736 7 | 29.217 5 | 25.5217 | 20.3325 | 38.057 5 | 25.558 3 | 39.155 0 | 34.535 0 | 20.020 0 | 39.145 8 | 28.662 5 | 28.573 3 |
| Sd | 2.4568 | 1.2220 | 1.8983 | 2.9585 | 2.1636 | 3.6378 | 3.5619 | 4.1413 | 2.3432 | 1.0058 | 3.6462 | 1.2803 |

Tabla 30 Datos de la Altura de germinados de 14 días, expresados en mm

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg ₁ | ChAg ₂ | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| R1 | 30.460 | 37.213 | 30.877 | 24.977 | 42.400 | 47.620 | 47.497 | 40.010 | 27.457 | 57.743 | 32.747 | 32.297 |
| R2 | 37.153 | 37.550 | 30.690 | 22.210 | 46.063 | 38.303 | 54.280 | 46.587 | 27.393 | 52.170 | 30.920 | 32.700 |
| R3 | 32.677 | 40.690 | 29.120 | 20.380 | 46.573 | 38.077 | 44.777 | 40.737 | 24.513 | 57.607 | 45.437 | 39.070 |
| R4 | 33.367 | 37.443 | 31.050 | 17.920 | 37.240 | 38.927 | 55.810 | 37.577 | 22.277 | 56.257 | 43.827 | 32.610 |
| R5 | 33.787 | 36.783 | 31.167 | 18.283 | 40.467 | 42.580 | 45.660 | 32.410 | 24.243 | 57.260 | 42.913 | 34.587 |
| Prom | 33.488 7 | 37.936 0 | 30.5807 | 20.7540 | 42.548 7 | 41.101 3 | 49.604 7 | 39.464 0 | 25.176 7 | 56.207 3 | 39.168 7 | 34.252 7 |
| Sd | 2.4169 | 1.5674 | 0.8362 | 2.9252 | 3.9080 | 4.0739 | 5.0911 | 5.1471 | 2.2267 | 2.3307 | 6.7877 | 2.8396 |

ANEXO 1.2.2 - DATOS SOBRE LONGITUD DE RAÍZ DE GERMINADOS

Tabla 31 Datos de longitud de raíz de germinados de 7 días expresado en mm

| Prueba | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 42.600 | 21.150 | 23.417 | 18.943 | 18.457 | 22.307 | 25.610 | 20.077 | 26.450 | 47.480 | 17.777 | 25.950 |
| R2 | 32.567 | 25.000 | 17.370 | 22.193 | 17.760 | 20.343 | 25.527 | 26.073 | 21.733 | 36.593 | 14.723 | 35.557 |
| R3 | 35.283 | 12.827 | 18.817 | 26.863 | 15.853 | 25.550 | 14.150 | 22.633 | 24.447 | 31.133 | 16.113 | 26.937 |
| R4 | 34.643 | 13.593 | 20.600 | 22.847 | 26.810 | 14.693 | 27.740 | 12.317 | 25.277 | 48.790 | 27.173 | 31.560 |
| Prom | 36.273 | 18.143 | 20.051 | 22.712 | 19.720 | 20.723 | 23.257 | 20.275 | 24.477 | 40.999 | 18.947 | 30.001 |
| Sd | 4.374 | 5.917 | 2.604 | 3.252 | 4.853 | 4.557 | 6.157 | 5.847 | 2.005 | 8.553 | 5.625 | 4.438 |

Tabla 32 Datos de longitud de raíz de germinados de 14 días, expresado en mm

| Prueba | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 38.367 | 24.993 | 24.583 | 25.037 | 24.260 | 22.550 | 27.813 | 28.047 | 10.683 | 29.907 | 17.467 | 17.013 |
| R2 | 36.503 | 27.450 | 22.447 | 26.077 | 25.210 | 22.043 | 28.573 | 29.643 | 16.323 | 35.757 | 18.627 | 22.233 |
| R3 | 34.463 | 28.557 | 22.440 | 20.990 | 21.120 | 22.130 | 18.340 | 27.780 | 14.957 | 38.353 | 13.243 | 27.720 |
| R4 | 33.040 | 29.137 | 19.923 | 17.920 | 26.223 | 25.403 | 19.907 | 21.240 | 22.103 | 41.730 | 16.787 | 28.133 |
| R5 | 39.033 | 25.970 | 23.353 | 16.043 | 23.627 | 18.313 | 21.927 | 26.913 | 17.060 | 42.680 | 17.543 | 31.413 |
| Prom | 36.281 | 27.221 | 22.549 | 21.213 | 24.088 | 22.088 | 23.312 | 26.725 | 16.225 | 37.685 | 16.733 | 25.303 |
| Sd | 2.539 | 1.734 | 1.710 | 4.356 | 1.928 | 2.523 | 4.642 | 3.221 | 4.110 | 5.147 | 2.059 | 5.686 |

ANEXO 1.2.3 - DATOS SOBRE PESO FRESCO DE GERMINADOS

Tabla 33 Datos sobre peso fresco de germinados (3 unidades por réplica) de 7 días, expresado en g

| Prueba | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 0.0455 | 0.0446 | 0.0372 | 0.0520 | 0.0270 | 0.0622 | 0.0439 | 0.0778 | 0.0495 | 0.0493 | 0.0798 | 0.0861 |
| R2 | 0.0618 | 0.0421 | 0.0401 | 0.0429 | 0.0543 | 0.0340 | 0.0609 | 0.0560 | 0.0518 | 0.0520 | 0.0570 | 0.0921 |
| R3 | 0.0522 | 0.0528 | 0.0426 | 0.0524 | 0.0296 | 0.0429 | 0.0434 | 0.0645 | 0.0401 | 0.0518 | 0.0621 | 0.0806 |
| R4 | 0.0476 | 0.0420 | 0.0352 | 0.0486 | 0.0465 | 0.0526 | 0.0585 | 0.0430 | 0.0399 | 0.0402 | 0.0561 | 0.0935 |
| Prom | 0.0518 | 0.0454 | 0.0388 | 0.0490 | 0.0394 | 0.0479 | 0.0517 | 0.0603 | 0.0453 | 0.0483 | 0.0637 | 0.0881 |
| Sd | 0.0072 | 0.0051 | 0.0032 | 0.0044 | 0.0132 | 0.0122 | 0.0093 | 0.0146 | 0.0062 | 0.0056 | 0.0110 | 0.0059 |

Tabla 34 Datos de peso fresco de germinados de 14 días, expresados en g

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 0.1867 | 0.1814 | 0.1835 | 0.1631 | 0.1576 | 0.1490 | 0.1949 | 0.1873 | 0.1630 | 0.1815 | 0.1793 | 0.1724 |
| R2 | 0.0920 | 0.1460 | 0.1620 | 0.1440 | 0.1540 | 0.1440 | 0.1980 | 0.1340 | 0.2080 | 0.2100 | 0.1880 | 0.1700 |
| R3 | 0.1257 | 0.1424 | 0.1091 | 0.1004 | 0.1559 | 0.1443 | 0.1572 | 0.1917 | 0.1031 | 0.1520 | 0.2052 | 0.3113 |
| R4 | 0.1410 | 0.0851 | 0.1010 | 0.1424 | 0.1220 | 0.1362 | 0.1695 | 0.1695 | 0.1394 | 0.1788 | 0.1814 | 0.2541 |
| R5 | 0.1562 | 0.1619 | 0.1463 | 0.1318 | 0.1568 | 0.1467 | 0.1761 | 0.1895 | 0.1331 | 0.1668 | 0.1923 | 0.2419 |
| Prom | 0.1403 | 0.1434 | 0.1404 | 0.1363 | 0.1493 | 0.1440 | 0.1791 | 0.1744 | 0.1493 | 0.1778 | 0.1892 | 0.2299 |
| Sd | 0.0352 | 0.0360 | 0.0350 | 0.0230 | 0.0153 | 0.0048 | 0.0172 | 0.0242 | 0.0391 | 0.0214 | 0.0103 | 0.0597 |

ANEXO 1.2.4 - DATOS SOBRE PESO SECO DE GERMINADOS

Tabla 35 Datos peso seco (3 germinados por réplica) de germinados de 7 días, expresado en g

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 0.0109 | 0.0082 | 0.0080 | 0.0072 | 0.0092 | 0.0105 | 0.0083 | 0.0072 | 0.0087 | 0.0085 | 0.0112 | 0.0074 |
| R2 | 0.0096 | 0.0102 | 0.0092 | 0.0082 | 0.0076 | 0.0099 | 0.0069 | 0.0096 | 0.0091 | 0.0082 | 0.0095 | 0.0103 |
| R3 | 0.0104 | 0.0106 | 0.0085 | 0.0084 | 0.0070 | 0.0082 | 0.0093 | 0.0061 | 0.0074 | 0.0089 | 0.0065 | 0.0077 |
| R4 | 0.0079 | 0.0101 | 0.0087 | 0.0078 | 0.0082 | 0.0091 | 0.0082 | 0.0079 | 0.0085 | 0.0075 | 0.0091 | 0.0085 |
| Prom | 0.0097 | 0.0098 | 0.0086 | 0.0079 | 0.0080 | 0.0094 | 0.0082 | 0.0077 | 0.0084 | 0.0083 | 0.0091 | 0.0085 |
| Sd | 0.0013 | 0.0011 | 0.0005 | 0.0005 | 0.0009 | 0.0010 | 0.0010 | 0.0015 | 0.0007 | 0.0006 | 0.0019 | 0.0013 |

Tabla 36 Datos de peso seco (3 germinados por replica) de germinados de 14 días, expresado en g

| Tratamiento | Agua | Fert | ChAg1 | ChAg2 | ChSo | ChSo1 | ChSo2 | ScAg1 | ScAg2 | ScSo | ScSo1 | ScSo2 |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| R1 | 0.0130 | 0.0110 | 0.0131 | 0.0117 | 0.0109 | 0.0103 | 0.0153 | 0.0144 | 0.0130 | 0.0106 | 0.0133 | 0.0119 |
| R2 | 0.0140 | 0.0160 | 0.0100 | 0.0160 | 0.0150 | 0.0110 | 0.0120 | 0.0110 | 0.0140 | 0.0160 | 0.0150 | 0.0150 |
| R3 | 0.0145 | 0.0152 | 0.0129 | 0.0117 | 0.0153 | 0.0112 | 0.0114 | 0.0189 | 0.0134 | 0.0127 | 0.0155 | 0.0133 |
| R4 | 0.0126 | 0.0170 | 0.0133 | 0.0098 | 0.0136 | 0.0116 | 0.0121 | 0.0118 | 0.0124 | 0.0126 | 0.0120 | 0.0135 |
| R5 | 0.0138 | 0.0131 | 0.0130 | 0.0117 | 0.0131 | 0.0108 | 0.0134 | 0.0167 | 0.0132 | 0.0117 | 0.0144 | 0.0126 |
| Prom | 0.0136 | 0.0145 | 0.0125 | 0.0122 | 0.0136 | 0.0110 | 0.0128 | 0.0146 | 0.0132 | 0.0127 | 0.0140 | 0.0133 |
| Sd | 0.0008 | 0.0024 | 0.0014 | 0.0023 | 0.0018 | 0.0005 | 0.0016 | 0.0033 | 0.0006 | 0.0020 | 0.0014 | 0.0012 |

ANEXO 2.- RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO REALIZADO A LOS DATOS RECOPIADOS EN EL PROYECTO, CON UN FACTOR DE SIGNIFICANCIA DE 0.05.

Análisis realizados en Microsoft Excel 2007.

Ho: Las muestras tienen la misma media

H1: Las muestras tienen medias diferentes

Con un valor de $F > F_{crit}$, se rechaza la Hipotesis nula (Ho), por lo tanto se acepta que existen diferencias significativas entre las medias de las muestras

Con un $p\text{-value} < 0.05$ se rechaza la Hipotesis nula (Ho), por lo tanto se acepta que existen diferencias significativas entre las medias de las muestras

Tabla 37 Resultados de ANOVA para altura de germinados de 7 días.

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 4 | 118.9467 | 29.73667 | 6.035644 |
| Fert | 4 | 116.87 | 29.2175 | 1.493203 |
| ChAg1 | 4 | 102.0867 | 25.52167 | 3.603693 |
| ChAg2 | 4 | 81.33 | 20.3325 | 8.752492 |
| ChSo | 4 | 152.23 | 38.0575 | 4.681284 |
| ChSo1 | 4 | 102.2333 | 25.55833 | 13.23372 |
| ChSo2 | 4 | 156.62 | 39.155 | 12.68716 |
| ScAg1 | 4 | 138.14 | 34.535 | 17.15056 |
| ScAg2 | 4 | 80.08 | 20.02 | 5.490763 |
| ScSo | 4 | 156.5833 | 39.14583 | 1.011632 |
| ScSo1 | 4 | 114.65 | 28.6625 | 13.29474 |
| ScSo2 | 4 | 114.2933 | 28.57333 | 1.6392 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 1960.468 | 11 | 178.2244 | 24.01027 | 2.46E-13 | 2.066608 |
| Within Groups | 267.2223 | 36 | 7.422841 | | | |
| Total | 2227.69 | 47 | | | | |

Tabla 38 Resultado de ANOVA de un factor para datos Altura de tallo para germinados de 14 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 15 | 502.33 | 33.489 | 13.553 |
| Fert | 15 | 569.04 | 37.936 | 10.815 |
| ChAgua1 | 15 | 458.71 | 30.581 | 18.847 |
| ChAgua2 | 15 | 311.31 | 20.754 | 27.314 |
| ChSo | 15 | 638.23 | 42.549 | 29.155 |
| ChSo1 | 15 | 616.52 | 41.101 | 42.481 |
| ChSo2 | 15 | 744.07 | 49.605 | 40.345 |
| ScAgua1 | 15 | 591.96 | 39.464 | 53.051 |
| ScAgua2 | 15 | 377.65 | 25.177 | 17.254 |
| ScSo | 15 | 843.11 | 56.207 | 72.052 |
| ScSo1 | 15 | 587.53 | 39.169 | 59.905 |
| ScSo2 | 15 | 513.79 | 34.253 | 18.398 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 15728.66 | 11 | 1429.878 | 42.55898 | 6.91E-43 | 2.354947 |
| Within Groups | 5644.391 | 168 | 33.59757 | | | |
| Total | 21373.05 | 179 | | | | |

Tabla 39 Resultados de ANOVA de un factor para longitud de raíz de germinados de 7 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 4 | 145.0933 | 36.27333 | 19.13436 |
| Fert | 4 | 72.57 | 18.1425 | 35.00779 |
| ChAg1 | 4 | 80.20333 | 20.05083 | 6.780151 |
| ChAg2 | 4 | 90.84667 | 22.71167 | 10.57452 |
| ChSo | 4 | 78.88 | 19.72 | 23.55227 |
| ChSo1 | 4 | 82.89333 | 20.72333 | 20.76965 |
| ChSo2 | 4 | 93.02667 | 23.25667 | 37.90758 |
| ScAg1 | 4 | 81.1 | 20.275 | 34.1856 |
| ScAg2 | 4 | 97.90667 | 24.47667 | 4.020274 |
| ScSo | 4 | 163.9967 | 40.99917 | 73.14811 |
| ScSo1 | 4 | 75.78667 | 18.94667 | 31.63709 |
| ScSo2 | 4 | 120.0033 | 30.00083 | 19.69888 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 2366.58 | 11 | 215.1437 | 8.159264 | 6.45E-07 | 2.066608 |
| Within Groups | 949.2489 | 36 | 26.36802 | | | |
| Total | 3315.829 | 47 | | | | |

Tabla 40 Resultado de ANOVA de un factor para datos Longitud de raíz de germinados de 14 días.

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 15 | 544.22 | 36.281 | 35.478 |
| Fert | 15 | 408.32 | 27.221 | 16.702 |
| ChAgua1 | 15 | 338.24 | 22.549 | 7.049 |
| ChAgua2 | 15 | 318.2 | 21.213 | 38.377 |
| ChSo | 15 | 361.32 | 24.088 | 23.341 |
| ChSo1 | 15 | 331.32 | 22.088 | 28.875 |
| ChSo2 | 15 | 349.68 | 23.312 | 53.907 |
| ScAgua1 | 15 | 400.87 | 26.725 | 68.933 |
| ScAgua2 | 15 | 243.38 | 16.225 | 35.473 |
| ScSo | 15 | 565.28 | 37.685 | 67.695 |
| ScSo1 | 15 | 251 | 16.733 | 22.224 |
| ScSo2 | 15 | 379.54 | 25.303 | 56.002 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 7109.955 | 11 | 646.3595 | 17.0823 | 2.45E-22 | 2.354947 |
| Within Groups | 6356.778 | 168 | 37.83797 | | | |
| Total | 13466.73 | 179 | | | | |

Tabla 41 Resultado de ANOVA de un factor para peso fresco de germinados de 7 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| Groups | Count | Sum | Average | Variance |
|--------|-------|---------|----------|----------|
| Agua | 4 | 0.2071 | 0.051775 | 5.25E-05 |
| Fert | 4 | 0.1815 | 0.045375 | 2.59E-05 |
| ChAg1 | 4 | 0.1551 | 0.038775 | 1.05E-05 |
| ChAg2 | 4 | 0.1959 | 0.048975 | 1.93E-05 |
| ChSo | 4 | 0.1574 | 0.03935 | 0.000174 |
| ChSo1 | 4 | 0.1917 | 0.047925 | 0.000148 |
| ChSo2 | 4 | 0.2067 | 0.051675 | 8.69E-05 |
| ScAg1 | 4 | 0.2413 | 0.060325 | 0.000214 |
| ScAg2 | 4 | 0.1813 | 0.045325 | 3.87E-05 |
| ScSo | 4 | 0.19327 | 0.048318 | 3.1E-05 |
| ScSo1 | 4 | 0.25497 | 0.063743 | 0.000122 |
| ScSo2 | 4 | 0.35241 | 0.088103 | 3.52E-05 |

ANOVA

| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Between Groups | 0.007883 | 11 | 0.000717 | 8.978134 | 2.07E-07 | 2.066608 |
| Within Groups | 0.002874 | 36 | 7.98E-05 | | | |
| Total | 0.010757 | 47 | | | | |

Tabla 42 Resultado de ANOVA de un factor para datos de Peso fresco de germinados de 14 días.

Anova: Single Factor

SUMMARY

| Groups | Count | Sum | Average | Variance |
|---------|-------|---------|---------|----------|
| Agua | 5 | 0.7016 | 0.1403 | 0.0012 |
| Fert | 5 | 0.7168 | 0.1434 | 0.0013 |
| ChAgua1 | 5 | 0.7019 | 0.1404 | 0.0012 |
| ChAgua2 | 5 | 0.68165 | 0.1363 | 0.0005 |
| ChSo | 5 | 0.74625 | 0.1493 | 0.0002 |
| ChSo1 | 5 | 0.72015 | 0.1440 | 0.0000 |
| ChSo2 | 5 | 0.89565 | 0.1791 | 0.0003 |
| ScAgua1 | 5 | 0.872 | 0.1744 | 0.0006 |
| ScAgua2 | 5 | 0.74655 | 0.1493 | 0.0015 |
| ScSo | 5 | 0.88905 | 0.1778 | 0.0005 |
| ScSo1 | 5 | 0.94615 | 0.1892 | 0.0001 |
| ScSo2 | 5 | 1.14965 | 0.2299 | 0.0036 |

ANOVA

| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
|---------------------|---------|----|----------|----------|----------|----------|
| Between Groups | 0.04318 | 11 | 0.003925 | 4.246602 | 0.000209 | 2.641845 |
| Within Groups | 0.04437 | 48 | 0.000924 | | | |
| Total | 0.08755 | 59 | | | | |

Tabla 43 Resultados ANOVA de un factor para peso seco de germinados de 7 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| Groups | Count | Sum | Average | Variance |
|--------|-------|---------|----------|----------|
| Agua | 4 | 0.03878 | 0.009695 | 1.73E-06 |
| Fert | 4 | 0.0391 | 0.009775 | 1.15E-06 |
| ChAg1 | 4 | 0.0344 | 0.0086 | 2.47E-07 |
| ChAg2 | 4 | 0.0316 | 0.0079 | 2.8E-07 |
| ChSo | 4 | 0.03191 | 0.007978 | 8.59E-07 |
| ChSo1 | 4 | 0.03765 | 0.009413 | 1.01E-06 |
| ChSo2 | 4 | 0.03267 | 0.008168 | 9.69E-07 |
| ScAg1 | 4 | 0.03074 | 0.007685 | 2.16E-06 |
| ScAg2 | 4 | 0.0337 | 0.008425 | 5.29E-07 |
| ScSo | 4 | 0.0331 | 0.008275 | 3.49E-07 |
| ScSo1 | 4 | 0.0363 | 0.009075 | 3.78E-06 |
| ScSo2 | 4 | 0.03387 | 0.008468 | 1.7E-06 |

ANOVA

| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
|---------------------|----------|----|----------|----------|----------|----------|
| Between Groups | 2.21E-05 | 11 | 2.01E-06 | 1.631371 | 0.131398 | 2.066608 |
| Within Groups | 4.43E-05 | 36 | 1.23E-06 | | | |
| Total | 6.63E-05 | 47 | | | | |

Tabla 44 Resultado de ANOVA de un factor para datos peso seco de germinados de 14 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| Groups | Count | Sum | Average | Variance |
|---------|-------|---------|---------|----------|
| Agua | 5 | 0.06785 | 0.0136 | 5.87E-07 |
| Fert | 5 | 0.0723 | 0.0145 | 5.8E-06 |
| ChAgua1 | 5 | 0.0623 | 0.0125 | 1.91E-06 |
| ChAgua2 | 5 | 0.0609 | 0.0122 | 5.24E-06 |
| ChSo | 5 | 0.0679 | 0.0136 | 3.1E-06 |
| ChSo1 | 5 | 0.05485 | 0.0110 | 2.37E-07 |
| ChSo2 | 5 | 0.06415 | 0.0128 | 2.41E-06 |
| ScAgua1 | 5 | 0.07275 | 0.0146 | 1.09E-05 |
| ScAgua2 | 5 | 0.066 | 0.0132 | 3.4E-07 |
| ScSo | 5 | 0.06355 | 0.0127 | 4.1E-06 |
| ScSo1 | 5 | 0.0702 | 0.0140 | 1.97E-06 |
| ScSo2 | 5 | 0.0663 | 0.0133 | 1.34E-06 |

ANOVA

| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|----------|
| Between Groups | 5.65E-05 | 11 | 5.14E-06 | 1.626904 | 0.12129 | 2.641845 |
| Within Groups | 0.000152 | 48 | 3.16E-06 | | | |
| Total | 0.000208 | 59 | | | | |

Tabla 45 Resultados del ANOVA de un factor realizado a los datos de capacidad antioxidante de plantas de 7 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 3 | 52.74138 | 17.58046 | 19.55331 |
| Fert | 3 | 79.5431 | 26.51437 | 3.178978 |
| ChAg1 | 3 | 72.5 | 24.16667 | 0.109418 |
| ChAg2 | 3 | 74.93966 | 24.97989 | 0.138253 |
| ChSo | 3 | 93.80172 | 31.26724 | 0.096537 |
| ChSo1 | 3 | 81.80172 | 27.26724 | 2.166246 |
| ChSo2 | 3 | 65.5 | 21.83333 | 0.106223 |
| ScAg1 | 3 | 57.88793 | 19.29598 | 3.237094 |
| ScAg2 | 3 | 76.24138 | 25.41379 | 3.531733 |
| ScSo | 3 | 65.75862 | 21.91954 | 2.57501 |
| ScSo1 | 3 | 89.56034 | 29.85345 | 2.306703 |
| ScSo2 | 3 | 69.7069 | 23.23563 | 0.376957 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 532.9182 | 11 | 48.44711 | 15.55432 | 2.39E-08 | 2.216309 |
| Within Groups | 74.75292 | 24 | 3.114705 | | | |
| Total | 607.6712 | 35 | | | | |

Tabla 46 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre capacidad antioxidante de germinados 14 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 5 | 159.0405 | 31.8081 | 35.2129 |
| Fert | 5 | 153.3009 | 30.66017 | 37.88413 |
| ChAg1 | 5 | 195.1241 | 39.02483 | 61.46003 |
| ChAg2 | 5 | 165.4405 | 33.0881 | 34.89785 |
| ChSo | 5 | 151.0638 | 30.21276 | 11.57227 |
| ChSo1 | 5 | 158.0888 | 31.61776 | 40.38147 |
| ChSo2 | 5 | 173.4147 | 34.68293 | 15.93513 |
| ScAg1 | 5 | 164.6414 | 32.92828 | 108.8306 |
| ScAg2 | 5 | 167.8362 | 33.56724 | 59.7988 |
| ScSo | 5 | 150.6905 | 30.1381 | 27.12581 |
| ScSo1 | 5 | 149.5879 | 29.91759 | 28.60863 |
| ScSo2 | 5 | 178.5233 | 35.70466 | 57.3584 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>Df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 402.3105 | 11 | 36.57368 | 0.845527 | 0.596966 | 1.99458 |
| Within Groups | 2076.264 | 48 | 43.2555 | | | |
| Total | 2478.575 | 59 | | | | |

Tabla 47 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de β -Caroteno de germinados 7 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 3 | 0.868598 | 0.289533 | 0.001516 |
| Fert | 3 | 0.466542 | 0.155514 | 6.17E-05 |
| ChAg1 | 3 | 1.202991 | 0.400997 | 0.000338 |
| ChAg2 | 3 | 0.84486 | 0.28162 | 0.000111 |
| ChSo | 3 | 0.739065 | 0.246355 | 0.000113 |
| ChSo1 | 3 | 1.005234 | 0.335078 | 0.000312 |
| ChSo2 | 3 | 1.287103 | 0.429034 | 0.000316 |
| ScAg1 | 3 | 0.825794 | 0.275265 | 9.51E-05 |
| ScAg2 | 3 | 0.983925 | 0.327975 | 0.000173 |
| ScSo | 3 | 0.767458 | 0.255819 | 0.001033 |
| ScSo1 | 3 | 0.79757 | 0.265857 | 0.000154 |
| ScSo2 | 3 | 0.801869 | 0.26729 | 0.000276 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 0.172379 | 11 | 0.015671 | 41.7946 | 6.15E-13 | 2.216309 |
| Within Groups | 0.008999 | 24 | 0.000375 | | | |
| Total | 0.181378 | 35 | | | | |

Tabla 48 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de β -Caroteno de germinados 14 días

Anova: Single Factor

SUMMARY

| <i>Groups</i> | <i>Count</i> | <i>Sum</i> | <i>Average</i> | <i>Variance</i> |
|---------------|--------------|------------|----------------|-----------------|
| Agua | 3 | 27.622 | 9.207333 | 8.129801 |
| Fert | 3 | 52.242 | 17.414 | 1.374732 |
| ChAg1 | 3 | 37.108 | 12.36933 | 0.336549 |
| ChAg2 | 3 | 80.766 | 26.922 | 2.112016 |
| ChSo | 3 | 63.008 | 21.00267 | 12.20785 |
| ChSo1 | 3 | 44.374 | 14.79133 | 1.835969 |
| ChSo2 | 3 | 46.37 | 15.45667 | 0.214185 |
| ScAg1 | 3 | 65.216 | 21.73867 | 1.288545 |
| ScAg2 | 3 | 34.522 | 11.50733 | 1.406633 |
| ScSo | 3 | 86.056 | 28.68533 | 6.566049 |
| ScSo1 | 3 | 37.818 | 12.606 | 1.285012 |
| ScSo2 | 3 | 28.764 | 9.588 | 3.870916 |

ANOVA

| <i>Source of Variation</i> | <i>SS</i> | <i>df</i> | <i>MS</i> | <i>F</i> | <i>P-value</i> | <i>F crit</i> |
|----------------------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|---------------|
| Between Groups | 1400.614 | 11 | 127.3286 | 37.60788 | 2E-12 | 2.216309 |
| Within Groups | 81.25652 | 24 | 3.385688 | | | |
| Total | 1481.871 | 35 | | | | |

Tabla 49 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de Ácido Ascórbico de germinados 14 días

Anova: Single Factor

| SUMMARY | | | | | | |
|---------|-------|--------|----------|----------|--|--|
| Groups | Count | Sum | Average | Variance | | |
| Agua | 3 | 27.622 | 9.207333 | 8.129801 | | |
| Fert | 3 | 52.242 | 17.414 | 1.374732 | | |
| ChAg1 | 3 | 37.108 | 12.36933 | 0.336549 | | |
| ChAg2 | 3 | 80.766 | 26.922 | 2.112016 | | |
| ChSo | 3 | 63.008 | 21.00267 | 12.20785 | | |
| ChSo1 | 3 | 44.374 | 14.79133 | 1.835969 | | |
| ChSo2 | 3 | 46.37 | 15.45667 | 0.214185 | | |
| ScAg1 | 3 | 65.216 | 21.73867 | 1.288545 | | |
| ScAg2 | 3 | 34.522 | 11.50733 | 1.406633 | | |
| ScSo | 3 | 86.056 | 28.68533 | 6.566049 | | |
| ScSo1 | 3 | 37.818 | 12.606 | 1.285012 | | |
| ScSo2 | 3 | 28.764 | 9.588 | 3.870916 | | |

| ANOVA | | | | | | |
|---------------------|----------|----|----------|----------|---------|----------|
| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
| Between Groups | 1400.614 | 11 | 127.3286 | 37.60788 | 2E-12 | 2.216309 |
| Within Groups | 81.25652 | 24 | 3.385688 | | | |
| Total | 1481.871 | 35 | | | | |

Tabla 50 Resultado de ANOVA de un factor para datos sobre contenido de Sulforafane de 14 días

Anova: Single Factor Sulforafane content 14 days. (mg/g PS)

| SUMMARY | | | | | |
|---------|-------|----------|-----------|-----------|--|
| Groups | Count | Sum | Average | Variance | |
| Agua | 3 | 2.679984 | 0.893328 | 0.0025581 | |
| Fert | 3 | 3.921556 | 1.3071853 | 0.0019735 | |
| ChAg1 | 3 | 4.39917 | 1.46639 | 0.053272 | |
| ChAg2 | 3 | 5.033002 | 1.6776673 | 0.0091377 | |
| ChSo | 3 | 4.486894 | 1.4956313 | 0.0190371 | |
| ChSo1 | 3 | 5.394956 | 1.7983187 | 0.0196179 | |
| ChSo2 | 3 | 2.678666 | 0.8928887 | 0.0014341 | |
| ScAg1 | 3 | 4.032554 | 1.3441847 | 0.0192367 | |
| ScAg2 | 3 | 4.099744 | 1.3665813 | 0.0004569 | |
| ScSo | 3 | 3.182838 | 1.060946 | 0.0348545 | |
| ScSo1 | 3 | 2.520388 | 0.8401293 | 0.0076202 | |
| ScSo2 | 3 | 2.577192 | 0.859064 | 0.003609 | |

| ANOVA | | | | | | |
|---------------------|-----------|----|-----------|-----------|----------|-----------|
| Source of Variation | SS | df | MS | F | P-value | F crit |
| Between Groups | 3.6832606 | 11 | 0.3348419 | 23.251865 | 3.74E-10 | 2.2163086 |
| Within Groups | 0.3456155 | 24 | 0.0144006 | | | |
| Total | 4.0288761 | 35 | | | | |

Table 51 t-test: Paired Two samples for Means of Sulforaphane content in 14 days plants against Control treatment (Agua) significance value 0.05

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>Fert</i> |
|------------------------------|-------------|-------------|
| Mean | 0.893 | 1.307 |
| Variance | 0.0026 | 0.0020 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.234 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -9.593 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.005 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.011 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChAg1</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.466 |
| Variance | 0.0026 | 0.0533 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.337 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -4.533 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.023 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.045 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChAg1</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.466 |
| Variance | 0.0026 | 0.0533 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.337 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -4.533 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.023 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.045 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChAg2</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.678 |
| Variance | 0.0026 | 0.0091 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.199 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -11.641 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.004 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.007 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChSo</i> |
|------------------------------|-------------|-------------|
| Mean | 0.893 | 1.496 |
| Variance | 0.0026 | 0.0190 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.185 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -7.566 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.009 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.017 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChSo1</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.798 |
| Variance | 0.0026 | 0.0196 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.078 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -10.798 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.004 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.008 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ChSo2</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 0.893 |
| Variance | 0.0026 | 0.0014 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.926 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | 0.036 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.487 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.975 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ScAg1</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.344 |
| Variance | 0.0026 | 0.0192 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.247 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -4.913 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.020 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.039 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ScAg2</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 1.367 |
| Variance | 0.0026 | 0.0005 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.333 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -13.411 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.003 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.006 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ScSo</i> |
|------------------------------|-------------|-------------|
| Mean | 0.893 | 1.061 |
| Variance | 0.0026 | 0.0349 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | 0.109 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | -1.544 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.131 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.263 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ScSo1</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 0.840 |
| Variance | 0.0026 | 0.0076 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.197 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | 0.844 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.244 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.487 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |

t-Test: Paired Two Sample for Means

| | <i>Agua</i> | <i>ScSo2</i> |
|------------------------------|-------------|--------------|
| Mean | 0.893 | 0.859 |
| Variance | 0.0026 | 0.0036 |
| Observations | 3 | 3 |
| Pearson Correlation | -0.169 | |
| Hypothesized Mean Difference | 0 | |
| df | 2 | |
| t Stat | 0.700 | |
| P(T<=t) one-tail | 0.278 | |
| t Critical one-tail | 2.920 | |
| P(T<=t) two-tail | 0.557 | |
| t Critical two-tail | 4.303 | |