

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas**

*Identificación y cuantificación de fitohormonas en Ulva sp. y Acanthophora  
spicifera por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la propuesta  
de un bio-producto*

**PROYECTO INTEGRADOR**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

Presentado por:

Alexander Javier Medina Ballesteros

Michelle Stefany Morales Mazzini

**GUAYAQUIL - ECUADOR**

Año: 2022

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi mamá Viviana, quien ha estado toda mi vida apoyándome en mis decisiones de vida. A mi familia, a mis amigos de la carrera apodados los Quimilovers, que sin ellos no hubiera sido lo mismo esta experiencia universitaria. A mi compañera de tesis por dedicación y buenos momentos compartidos a lo largo de este tiempo. A mis amigos más íntimos, que me han apoyado en todo este ajetreo, a mis mascotas: Choko, Blanca y Andrés Paulo; y a la PhD. Taylor Swift que ha sido mi musa musical durante estos últimos meses.

Alexander Medina Ballesteros

Dedico este trabajo a mi familia y en especial a mis hermanos porque sé que lograrán grandes cosas. A mis mascotas: Luna, Mickey, Monchi, Carlota, Monkey, Garfield y Pancho, por simplemente existir. A mi compañero de tesis por su ayuda incondicional y paciencia infinita. A mis amigos de la carrera y compañeros de trabajo que me alentaron cuando más lo necesité. Finalmente, al anime que hizo posible que me levantara del bajón: Boku no Hero (PLUS ULTRA).

Michelle Morales Mazzini

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradecemos a Dios por permitirnos finalizar esta etapa universitaria, sin él, no hubiera sido posible todo lo vivido estos cinco años.

A nuestros padres, que han sido y seguirán siendo nuestra guía en la vida desde siempre y que hoy en día nos siguen apoyando y queriendo.

A nuestros amigos de la carrera, con quienes hemos creado hermosas e increíbles anécdotas juntos.

A nuestras mascotas, que nos acompañaron por largas horas para la creación de este trabajo.

A nuestra tutora PhD. Patricia Manzano, por su apoyo y fe desde el día uno en conjunto con los otros grupos dentro del laboratorio. Al MSc. Michael Rendón por su paciencia y apoyo en el manejo del equipo especializado, y al resto del equipo de la doctora.

Finalmente, agradecer una vez más a todos que han tenido esperanza y nos han dado sus palabras de aliento.

## DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Alexander Medina* y *Michelle Morales* y damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



---

Alexander Medina



---

Michelle Morales

## EVALUADORES

**Patricia  
Manzano  
Santana** Firmado  
digitalmente por  
Patricia Manzano  
Santana  
Fecha: 2023.02.02  
16:33:36 -05'00'

---

**Nadia Flores, Mg.**

PROFESOR DE LA MATERIA

**Patricia Manzano Santana, PhD**

PROFESOR TUTOR

## RESUMEN

El trabajo de investigación presenta la identificación y cuantificación de fitohormonas en las macroalgas *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* cosechadas en dos meses diferentes procedentes de la costa ecuatoriana por el método cromatográfico HPLC, que permita el desarrollo de un bioestimulante. Las fitohormonas sujetas para cuantificarse individualmente fueron el ácido giberélico (GA3), el ácido indolacético (AIA) y la kinetina (KIN) y su extracción se dio con muestras en base seca siguiendo el protocolo del CIBE. El equipo HPLC utilizó una gradiente cuaternaria empleando acetonitrilo como fase móvil y la solución acuosa de ácido fórmico al 0.1% como solvente. Además, de metanol grado HPLC y agua tipo I para las purgas. La columna utilizada fue la C-18 con dimensiones 3.5  $\mu$ m, 4.6x100 mm a 35°C. La longitud de onda empleada para la detección de kinetina y de ácido indolacético fue de 278 nm y para el ácido giberélico fue de 195 nm. La cuantificación se dio por triplicado y los resultados obtenidos mostraron que en *Ulva* sp. la cantidad de fitohormonas es mayor en septiembre 2022 con 20.79 $\pm$ 4.31 mg/kg (GA3), 13.24 $\pm$ 3.37 mg/kg (AIA) y 2.00 $\pm$ 0.81 mg/kg (KIN) mientras que la *Acanthophora spicifera* arrojó mejores resultados en enero 2023 con 8.68 $\pm$ 1.08 mg/kg (GA3), 3.12 $\pm$ 0.13 mg/kg (AIA) y 0.70 $\pm$ 0.01 mg/kg (KIN). Finalmente, se realizó un pequeño diseño de una planta de extracto bioestimulante a base de las macroalgas estudiadas con composiciones de fitohormonas que la hacen rentable en el mercado. Los resultados que se presentan en este estudio no han sido reportados en la literatura para las especies de macroalgas que crecen en la costa ecuatorianas.

**Palabras claves:** *Ulva* sp., *Acanthophora spicifera*, fitohormonas, HPLC, bioestimulantes

## ABSTRACT

The research work presents the identification and quantification of phytohormones in the macroalgae *Ulva* sp. and *Acanthophora spicifera* harvested in two different months from the Ecuadorian coast by the HPLC chromatographic method, which allows the development of a biostimulant. The phytohormones subjected to individual quantification were gibberellic acid (GA3), indolacetic acid (AIA) and kinetin (KIN) and their extraction was done with dry samples following the CIBE protocol. The HPLC equipment used a quaternary gradient employing acetonitrile as mobile phase and 0.1% formic acid aqueous solution as solvent. In addition, HPLC grade methanol and type I water were used for the purges. The column used was C-18 with dimensions 3.5  $\mu$ m, 4.6x100 mm at 35°C. The wavelength used for the detection of kinetin and indolacetic acid was 278 nm and for gibberellic acid it was 195 nm. Quantification was given in triplicate and the results obtained showed that in *Ulva* sp. the amount of phytohormones is higher in September 2022 with 20.79 $\pm$ 4.31 mg/kg (GA3), 13.24 $\pm$ 3.37 mg/kg (AIA) and 2.00 $\pm$ 0.81 mg/kg (KIN) while *Acanthophora spicifera* gave better results in January 2023 with 8.68 $\pm$ 1.08 mg/kg (GA3), 3.12 $\pm$ 0.13 mg/kg (AIA) and 0.70 $\pm$ 0.01 mg/kg (KIN). Finally, a small design of a biostimulant extract plant was made based on the studied macroalgae compositions of phytohormones that make it profitable in the market. The results presented in this study have not been reported in the literature for the macroalgae species that grow on the Ecuadorian coast.

**Keywords:** *Ulva* sp., *Acanthophora spicifera*, phytohormones, HPLC, biostimulants.

# ÍNDICE GENERAL

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL .....	1
DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
DECLARACIÓN EXPRESA .....	IV
EVALUADORES .....	V
RESUMEN .....	VI
ABSTRACT .....	II
ÍNDICE GENERAL .....	III
ABREVIATURAS .....	VII
SIMBOLOGÍA .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS .....	X
CAPÍTULO 1 .....	1
1. Introducción.....	1
1.1 Descripción del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General .....	3

1.3.2	Objetivos Específicos.....	4
1.4	Marco teórico .....	4
1.4.1	Bioestimulantes .....	4
1.4.2	Algas marinas.....	5
1.4.3	Ulva sp. y Acanthophora spicifera .....	7
1.4.4	Fitohormonas presentes en estas macroalgas .....	8
	CAPÍTULO 2.....	14
2.	METODOLOGÍA .....	14
2.1	Tipo de investigación .....	14
2.2	Selección de fitohormonas .....	15
2.3	Comparación de diferentes métodos extractivos de fitohormonas en biomasa algal .....	16
2.3.1	Elección del método extractivo.....	17
2.4	Materiales y equipos.....	18
2.4.1	Muestras de Ulva sp. y Acanthophora spicifera.....	18
2.4.2	Reactivos.....	19
2.4.3	Equipos.....	20
2.5	Esquema de trabajo .....	21
2.5.1	Condiciones instrumentales para el HPLC.....	23
2.5.2	Curva de calibración.....	24

2.5.3	Pretratamiento de la muestra .....	26
2.5.4	Preparación de la muestra.....	27
2.6	Análisis de costos: Diseño de planta como propuesta para extracto de macroalgas	31
2.6.1	Elección de la tecnología de la planta a diseñar .....	32
2.6.2	Descripción de proceso de la planta escala como propuesta de bioestimulante	34
	CAPÍTULO 3 .....	36
3.	RESULTADOS Y ANALÍISIS .....	36
3.1	Identificación de fitohormonas.....	36
3.1.1	Curvas de calibración .....	36
3.2	Cuantificación de Fitohormonas .....	45
3.2.1	Cuantificación de fitohormonas en <i>Ulva</i> sp. ....	45
3.2.2	Cuantificación de fitohormonas en <i>Acanthophora spicifera</i> .....	50
3.3	Comparación con otros estudios.....	52
3.4	Análisis de costos .....	53
	CAPÍTULO 4.....	63
4.	Conclusiones y Recomendaciones .....	63
4.1	Conclusiones .....	63
4.2	Recomendaciones.....	64

Referencias.....	66
APÉNDICE.....	72

**ABREVIATURAS**

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (en inglés, High Performance Liquid Chromatography)
GA3	Ácido giberélico
AIA	Ácido indolacético
KIN	Kinetina
EBLD	Extracto bioestimulante líquido diluido

**SIMBOLOGÍA**

kg	Kilogramo
g	Gramo
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
m <sup>3</sup>	Metro cúbico
L	Litro
mL	Mililitro
nmol	Nanomol
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
min	Minutos
°C	Grados Celsius
pH	Potencial de hidrógeno
UPS	Unidades prácticas de salinidad
HCl	Ácido clorhídrico
NaOH	Hidróxido de sodio
MeOH	Metanol
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Macroalgas</i> receptadas en el laboratorio .....	19
Figura 2. <i>Esquema de trabajo en la extracción, identificación y cuantificación de GA3, AIA y KIN</i> .....	22
Figura 3. <i>Pretratamiento de las muestras</i> .....	27
Figura 4. <i>Preparación de las muestras</i> .....	28
Figura 5. <i>Preparación de las muestras (continuación)</i> .....	30
Figura 6. <i>Preparación de las muestras (continuación)</i> .....	30
Figura 7. <i>Diagrama de bloques del proceso de extracción</i> .....	32
Figura 8. <i>Diagrama de flujo de proceso de la propuesta de planta</i> .....	34
Figura 9. <i>Cromatograma del ácido giberélico</i> .....	38
Figura 10. <i>Curva de calibración del ácido giberélico</i> .....	39
Figura 11. <i>Cromatograma del ácido indolacético</i> .....	41
Figura 12. <i>Curva de calibración del ácido indolacético</i> .....	42
Figura 13. <i>Cromatograma de la kinetina</i> .....	44
Figura 14. <i>Curva de calibración de la kinetina</i> .....	45
Figura 15 <i>Comparación de muestras de Ulva sp. analizadas en dos meses diferentes</i> ....	48
Figura 16. <i>Modelo de desarrollo hormonal en las distintas etapas durante el ciclo de vida de la planta</i> .....	50
Figura 17. <i>Proyección de rentabilidad a 5 años</i> .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Fitohormonas reportadas en Ulva sp. y Acanthophora spicifera a nivel internacional</i> .....	9
Tabla 2. <i>Estructura química de auxinas más reconocidas</i> .....	11
Tabla 3. <i>Estructura química de citoquininas más reconocidas en tejidos jóvenes de plantas</i> .....	12
Tabla 4. <i>Estructura química de la giberelina más común</i> .....	13
Tabla 5. <i>Información sobre fitohormonas seleccionadas</i> .....	15
Tabla 6. <i>Comparación de los parámetros principales de los diferentes métodos de extracción</i> .....	16
Tabla 7. <i>Parámetros característicos en la extracción de fitohormonas</i> .....	17
Tabla 8. <i>Información de recolección de macroalgas Ulva sp. y Acanthophora spicifera</i>	18
Tabla 9. <i>Lista de reactivos utilizados en los diferentes procesos y análisis</i> .....	19
Tabla 10. <i>Condiciones instrumentales para análisis de muestras en el HPLC</i> .....	23
Tabla 11. <i>Diluciones de estándar realizadas para la curva de calibración</i> .....	25
Tabla 12. <i>Resultados HPLC (GA3) de la corrida de las disoluciones del patrón mix</i> .....	37
Tabla 13. <i>Resultados HPLC (AIA) de la corrida de las disoluciones del patrón mix</i> .....	40
Tabla 14. <i>Resultados HPLC (KIN) de la corrida de las disoluciones del patrón mix</i> .....	43
Tabla 15. <i>Cuantificación de fitohormonas en Ulva sp.</i> .....	46
Tabla 16. <i>Condiciones meteorológicas en el mes de agosto y septiembre de 2022 y enero de 2023 en Guayaquil</i> .....	47
Tabla 17. <i>Comparación de fitohormonas en Ulva sp. cuantificadas con estudios de otros países</i> .....	49

Tabla 18. *Cuantificación de fitohormonas en Acanthophora spicifera* ..... 51

Tabla 19. *Condiciones meteorológicas en el mes de agosto, septiembre y diciembre de 2022 y enero de 2023 en Santa Elena*..... 51

Tabla 20. *Comparación de fitohormonas en Acanthophora spicifera cuantificadas con estudios de otros países*..... 53

Tabla 21. *Información técnica de los equipos de la propuesta de planta* ..... 54

Tabla 22. *Costo total de los equipos básicos de la propuesta de planta* ..... 55

Tabla 23. *Consumo eléctrico de los equipos de la propuesta de planta*..... 56

Tabla 24. *Costo unitario de reactivos y materia prima de la propuesta de planta* ..... 56

Tabla 25. *Gasto de producción diaria de la propuesta de planta* ..... 57

Tabla 26. *Composición de fitohormonas del EBLD en ppm*..... 58

Tabla 27. *Desglose de los ingresos diarios de la propuesta de planta*..... 59

Tabla 28. *Desglose de la inversión inicial para puesta en marcha*..... 59

Tabla 29. *Balance de ganancia neta mensual*..... 60

Tabla 30. *Flujo de caja de la propuesta de planta* ..... 60

Tabla 31. *Análisis de sensibilidad del precio de venta de EBLD de la propuesta de planta*  
..... 62

# CAPÍTULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Descripción del problema

El proyecto DIPSIMAR (Desarrollo e Implementación Piloto de Sistemas de Maricultura que generen incentivos a la Conservación del Manglar) es una iniciativa que se desarrolla gracias al convenio entre el Ministerio del Ambiente y Agua y la Escuela Politécnica del Litoral, a través del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM). Su objetivo es impulsar el desarrollo económico de las comunidades a partir del cultivo de moluscos y macroalgas nativas que sirven como materia prima para el desarrollo de bioproductos.

Los extractos de macroalgas son ampliamente utilizados en la agricultura como bioestimulantes para el crecimiento vegetal constituyendo una alternativa ecológica frente al consumo de productos agroquímicos sintéticos (Espinosa-Antón et al., 2020). El efecto bioestimulante lo proporciona la presencia de fitohormonas (Oliveira, 2022) las cuales estimulan el crecimiento vegetal y ofrecen una mayor protección frente a diferentes tipos de estrés abiótico y biótico (González, 2022).

Para llevar a cabo el objetivo del proyecto DIPSIMAR se seleccionaron para estudio dos algas nativas del Ecuador: *Ulva* sp. cosechada en Puerto el Morro y *Acanthophora spicifera* cosechada en San Pedro. Las dos cuentan con información

bibliográfica de sus aplicaciones y caracterización química. Sin embargo, los datos recopilados se basan en otros entornos geográficos distintos a Ecuador interfiriendo así en el desarrollo de un potencial bioproducto. Además, de acuerdo con el trabajo de investigación “Variación espaciotemporal en la composición de macroalgas en la zona intermareal rocosa en Salango, provincia de Manabí, Ecuador” (Sánchez & Torres, 2021), se evidencia que la temporada en la que es cultivada la macroalga repercute en su composición y características debido a la gran diferencia de condiciones climáticas.

Respecto a fitohormonas, el estudio de las dos macroalgas no es muy extenso y solo existe información documentada de tres países: México (García et al., 2020) e India (Gupta et al., 2011) para *Ulva* sp. y Vietnam (Guillén et al., 2022) para *Acanthophora spicifera*. Por lo tanto, esta información no puede ser utilizada para el desarrollo de un bioestimulante si no se ha realizado un estudio enfocado en fitohormonas presentes en la materia prima algal cosechada en Ecuador.

## 1.2 Justificación del problema

Los beneficios en la aplicación de extractos de algas en cultivos han sido demostrados en numerosos estudios, mejorando la germinación y establecimiento de plántulas, incrementando la resistencia a estrés abiótico y biótico e incluso se ha demostrado su valor en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Khan et al., 2009). Además de las fitohormonas, los extractos de algas tienen en su composición otras sustancias bioactivas que favorecen el crecimiento y desarrollo de la planta como polisacáridos, ácidos grasos, minerales, aminoácidos, proteínas, lípidos,

vitaminas, entre otros. Estas sustancias pueden encontrarse o no en diferentes especies de algas, teniendo en cuenta que, para cada especie, las concentraciones obtenidas y la estructura química de cada sustancia pueden variar por el método de extracción y la época del año (Oliveira, 2022).

Por lo tanto, es menester contrastar la información recopilada en otros países como México, India y Vietnam sobre fitohormonas en macroalgas *Ulva* sp y *Acanthophora spicifera* a un entorno más específico de crecimiento: Ecuador. Considerando necesario identificar si existe diferencia entre dos cosechas en distintos meses de la misma macroalga (*Ulva* sp y *Acanthophora spicifera*) con el fin de determinar aplicaciones apropiadas para diferentes etapas del año y teniendo como propósito principal identificar y cuantificar el potencial de estas macroalgas como materia prima para el desarrollo de un posible bioproducto que reemplace el uso de productos químicos en exceso para el suelo y plantas.

### **1.3 Objetivos**

#### ***1.3.1 Objetivo General***

Determinar ácido giberélico, ácido indolacético y kinetina en dos macroalgas de la zona costera ecuatoriana (*Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera*) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la propuesta de desarrollo de un bio-producto.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Establecer las curvas de calibración del ácido giberélico, ácido indolacético y kinetina mediante HPLC.
- Medir la concentración de ácido giberélico, ácido indolacético y kinetina en macroalgas *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* mediante HPLC.
- Diseñar una planta procesadora de extracto de macroalgas para la propuesta de elaboración potencial de un bio-producto.

## **1.4 Marco teórico**

### **1.4.1 Bioestimulantes**

El concepto de bioestimulantes vegetales ha evolucionado a lo largo de este siglo y sigue en constante modificación, debido a la diversidad de materia prima que pueda considerarse bioestimulante. Una de las últimas definiciones a nivel internacional la expone Yakhin (2017) como:

Bioestimulantes son productos basados en insumos, mayormente de origen natural, utilizados en dosis ultra pequeñas y pequeñas para la modificación de procesos fisiológicos y bioquímicos de plantas con el objetivo de una realización más completa del potencial genético de su productividad debido a cambios en el estado hormonal, activación de procesos metabólicos, aumento de la eficiencia de la nutrición, estimulación del crecimiento, desarrollo y fortalecimiento de la capacidad para resistir los efectos negativos de varios factores de estrés (Yakhin et al., 2017, p.5).

De la inmensa cantidad de sustancias y microorganismos con la capacidad de servir como bioestimulante, el profesor Patrick du Jardin (2015) desarrolló una clasificación en la que considero 7 categorías de bioestimulantes según sus fuentes de producción: ácidos húmicos y fúlvicos, aminoácidos o proteínas hidrolizadas, extractos de algas y plantas, quitosano, sales inorgánicas, hongos y bacterias beneficiosos (du Jardin, 2015). De los mencionados, los extractos de algas marinas a nivel internacional representan un 33% del mercado global de bioestimulantes naturales debido a su biodegradabilidad, no tóxico e inocuo para la salud humana y animal (el Boukhari et al., 2020).

#### ***1.4.2 Algas marinas***

Las algas marinas es el clásico nombre dado a las macroalgas marinas bénticas que representan un grupo variado de organismos marinos fotosintéticos eucariotas (Roesijadi et al., 2010). Las macroalgas están distribuidas mundialmente y abundan los entornos costeros del país y del mundo, sobre todo si existe sustrato adecuado para su fijación. También son encontradas en zonas ajenas a la costa como las zonas tropicales, templados y polares(Roesijadi et al., 2010). Actualmente, existen alrededor de 10,000 especies macroalgas, las cuales se pueden clasificar según su coloración: pardas (Phaeophytas), verdes (Chlorophytas) y rojas (Rhodophytas)(Pangestuti et al., 2021).

Las algas representan un papel importante dentro del contexto ecológico, social y económico debido a sus diversos usos como alimento, medicina, material de construcción, etc. (Pangestuti et al., 2021). Su principal atractivo es la presencia de

ciertos polisacáridos denominados ficocoloides, en donde destacan el agar y extractos de carragenina (extraídas de algas rojas), que en la industria alimentaria y farmacéutica son ampliamente requeridas (D'armas et al., 2019). Aunque su composición química abarca desde componentes nutricionales hasta fitohormonas que son usadas ampliamente en bioinsumos para la agricultura (Tan et al., 2021). Sin embargo, sus propiedades químicas y nutricionales se desconocen del todo debido a los diversos factores como especie, estación del año, zona geográfica, entre otros, que modifican su composición química y nutricional (D'armas et al., 2019).

Los extractos de algas marinas también sirven como bioestimulantes, mejorando la germinación y el establecimiento de semillas, mejorando el crecimiento de las plantas, el rendimiento, la floración y la producción de frutos, aumentando la resistencia al estrés biótico y abiótico y mejorando la vida útil postcosecha (Calvo et al., 2014). Varios autores concuerdan que estos efectos bioestimulantes se deben a la acción combinada de los componentes presentes en estos organismos marinos, entre ellos las fitohormonas u hormonas reguladoras de crecimiento, polisacáridos, vitaminas, polifenoles, esteroides, poliaminas y compuestos relacionados (du Jardín, 2015; el Boukhari et al., 2020).

Comercialmente, la mayoría de los bioestimulantes naturales provienen de algas pardas, especies como *A. nodosum*, *Laminaria* spp., *Ecklonia maxima*, *Sargassum* spp., y *Durvillaea* spp, por su muy alto contenido de compuestos bioactivos (Craigie, 2011; Espinosa-Antón et al., 2020). Aunque especies como *Fucus serratus*, *Enteromorpha*

*intestinalis*, *Ulva lactuca*, y *Kappaphycus alvarezii*, cuya pigmentación no es la parda, son usadas en la industria (Craigie, 2011).

### **1.4.3 *Ulva sp.* y *Acanthophora spicifera***

Dominguez & Loret (2019) refiere a la *Ulva sp.* como una macroalga del filo Chlorophytas, descubierta en el Mar Báltico en el siglo XVII, cuya reproducción se da por dos vías: sexual y fragmentación del talo. Esto le proporciona la capacidad de distribuirse rápidamente en superficies de agua llegando a cubrirla, representando un potencial peligro al reducir la biodiversidad marina en cuerpos de agua incluyendo otras especies de algas. Sin embargo, el cultivo controlado y sostenible de la macroalga la convierte en una alternativa para la protección de la vida marina y una fuente de biomasa que puede llegar a satisfacer las necesidades del mercado (Dominguez & Loret, 2019), generar incentivos para la conservación de otras especies vegetales como el manglar o como alternativa al consumo de estimulantes sintéticos (Espinosa-Antón et al., 2020).

Pereira (2017) describe la *Acanthophora spicifera* como una macroalga de pigmentación roja del filo Rhodophytas que crece en zonas tropicales y regiones subtropicales y habita en la región supra mareal en donde sufre cambios constantes en los factores abióticos. La *Acanthophora spicifera* presenta un color marrón rojizo o color verdoso y su reproducción se da de manera asexuada a través de esporas la que la hace potencial especie invasora en otras zonas. Presenta compuestos de interés como

flavonoides con actividad antibacteriana, antitumoral, procoagulante y antioxidante que son importantes en la industria nutraceútica (Pereira et al., 2017a).

#### **1.4.4 Fitohormonas presentes en estas macroalgas**

Las fitohormonas son pequeños compuestos orgánicos sintetizados de señalización que actúan hasta un punto en todos los aspectos de crecimiento y desarrollo de las plantas, por si sola, una fitohormona puede regular varias funciones celulares y procesos de desarrollo (García F., 2003). Asimismo, múltiples hormonas pueden actuar en conjunto y estar involucrados en la regulación de un solo proceso (Sezgin & Kahya, 2018). Se han identificado en el extracto de macroalgas sustancias reguladores del crecimiento vegetal tales como ácido abscísico, auxinas, citoquininas, giberelinas, jasmonatos o salicilatos que en conjunto regulan el metabolismo de las células vegetales e impulsar la producción y el crecimiento (García et al., 2020). En la Tabla 1, se resume información recolectada de fitohormonas identificadas en extractos de *Ulva* sp. cosechadas en Veraval, situada en la costa oeste de la India (N 20° 54.870; E 70° 20.830) (Gupta et al., 2011) y en la Bahía de Mazatlán, al noroeste de México (23°1 02 9.10' LN, 106°25029.70 LW) (García et al., 2020); y en extracto de *Acanthophora spicifera* cosechada en Vietnam (Guillén et al. ,2022).

**Tabla 1.**

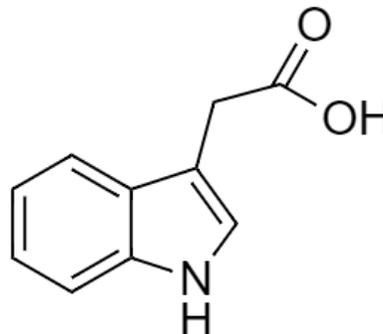
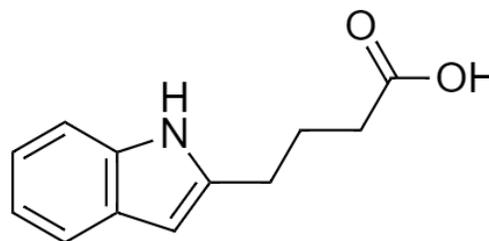
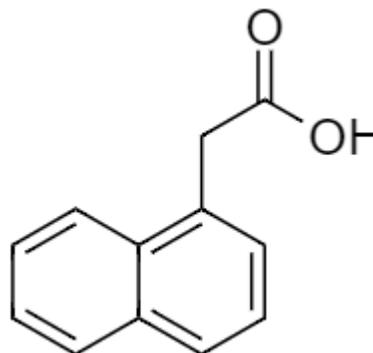
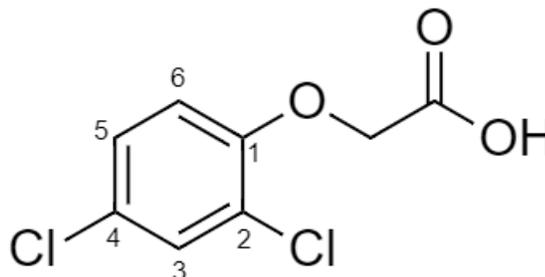
*Fitohormonas reportadas en Ulva sp. y Acanthophora spicifera a nivel internacional*

Fitohormonas	<i>Ulva sp.</i>		<i>Acanthophora spicifera</i>
	India (Gupta et al., 2011)	México (García et al., 2020)	Vietnam (Guillén ,2022)
	Concentración (nmol g <sup>-1</sup> )	Concentración (ng g <sup>-1</sup> )	Concentración (µg g <sup>-1</sup> )
<b>Ácido abscísico</b>	34.85±1.75	17.8±5.20	-
<b>Auxinas</b>	32.50±2.13	49.3±5.20	-
<b>Citoquininas</b>	2.83±1.63	16.29±4.78	15.30
<b>Giberelinas</b>	3.43±1.68	2.11±0.69	157.00
<b>Jasmonatos</b>	-	1.5±0.05	-
<b>Silicatos</b>	5.86±2.72	67.6±4.20	-

La clasificación de fitohormonas ha ido creciendo con el paso del tiempo comenzando desde el quinteto clásico hasta el reconocimiento de nuevos miembros: brasinoesteroide, encargada de la regulación de varios procesos vegetales que incluyen la germinación de la semilla, división celular, elongación celular, desarrollo floral y resistencia contra varios factores estresantes como la toxicidad de metales pesados (Saini et al., 2021) ; y estrigolactona, sustancia importante en la formación de la dominancia apical y que junto a las auxinas llevan a cabo el efecto inhibitorio sobre las yemas laterales (Sytar et al., 2019). La Tabla 1 reporta la presencia de ácido abscísico, auxinas, citoquininas, giberelinas, jasmonatos y silicatos en extractos de *Ulva sp.* (Gupta et al.,

2011; García et al., 2020a); y, en extractos de *Acanthopora spicifera*, citoquininas y giberelinas (Guillén et al., 2022).

El grupo de las auxinas estimulan el crecimiento de la planta con el aumento de la elongación celular y proliferación. Hasta el momento, solo el ácido indolacético (AIA) es la única hormona que se sintetiza naturalmente en las plantas. Aunque existen muchos compuestos sintéticos que tienen efectos similares al AIA (Sezgín & Kahya, 2018) pero son producidos de manera sintética, como el ácido indolbutírico (IBA), el  $\alpha$ -ácido naftalenoacético (NAA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (Guerrero, 2022). En la Tabla 2 se presenta las diferentes estructuras químicas de las auxinas mencionadas. Las auxinas también se relacionan con la diferenciación de tejidos, algunos tropismos, disminución de la abscisión de los órganos, inducción de la formación de las raíces adventicias, inducción de la diferenciación vascular, el estímulo de la dominancia apical (Borjas-Ventura et al., 2020), aumento del contenido osmótico celular, aumento de la permeabilidad celular y aumento de la producción proteica (Hurtado, 2018).

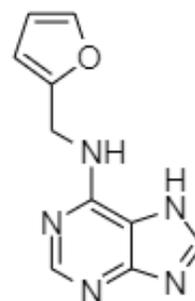
**Tabla 2.***Estructura química de auxinas más reconocidas***Ácido indolacético (AIA)****ácido indolbutírico (IBA)** **$\alpha$ -ácido naftalenoacético (NAA)****Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)**

El grupo de las citoquininas son eficaces en la división celular y retrasan el envejecimiento de la planta. En conjunto con las auxinas, contribuyen en la formación y en el desarrollo de órganos en medios de cultivo de tejidos. La kinetina, la 6-benciladenina y zeatina son de las citoquininas más comunes encontrados en tejidos jóvenes, y sus estructuras químicas se muestran en la Tabla 3. Además, son eficaces en el rompimiento de la inactividad, la aceleración de transferencia de carbohidratos e inhibición del crecimiento de brotes terminales (Sezgín & Kahya, 2018).

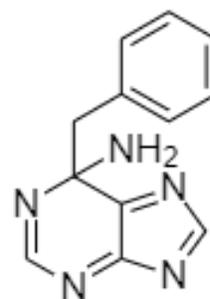
**Tabla 3.**

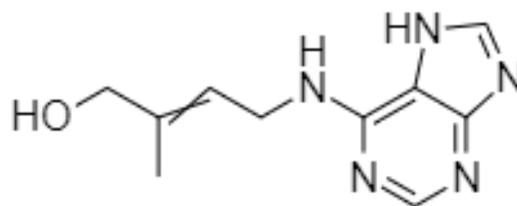
*Estructura química de citoquininas más reconocidas en tejidos jóvenes de plantas*

**Kinetina (KIN)**



**6-benciladenina (BA)**

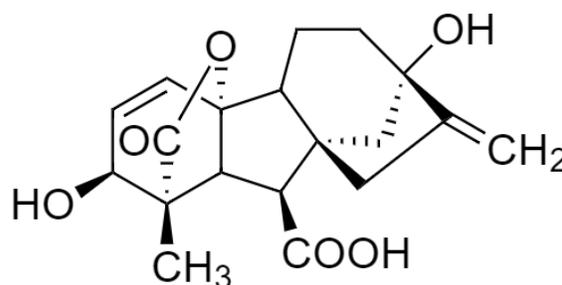


**Zeatina (Z)**

El grupo de las giberelinas, como las auxinas, promueven el crecimiento y desarrollo en dosis pequeñas. Las giberelinas presentan al menos 126 formas ubicadas en yemas, embriones, raíces, hojas, frutos y flores. Pero su forma más común es el ácido giberélico (GA3) cuya estructura química se ilustra en la Tabla 4 (Sezgin & Kahya, 2018).

**Tabla 4.**

*Estructura química de la giberelina más común*

**Ácido giberélico (GA3)**

# CAPÍTULO 2

## 2. METODOLOGÍA

El objetivo principal del trabajo de investigación es identificar y cuantificar la presencia de tres fitohormonas: Kinetina, Ácido Giberélico y Ácido Indolacético en las algas *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* para la propuesta de un potencial bioproducto contrastando, además, la presencia de fitohormonas en macroalgas cosechadas en dos épocas del año.

La presente investigación se dio a cabo en el Laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), dentro de la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Campus Gustavo Galindo en el Km. 30.5 vía Perimetral junto al edificio de Admisiones Ing. Enrique Bayot Aráuz, en la ciudad de Guayaquil, provincia del Guayas, Ecuador. En esta sección, se detallará los materiales, reactivos, equipos y esquema de trabajo utilizados a lo largo del trabajo.

### 2.1 Tipo de investigación

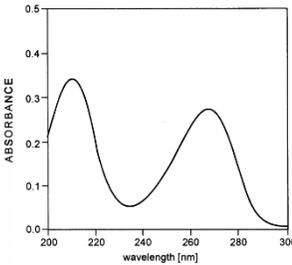
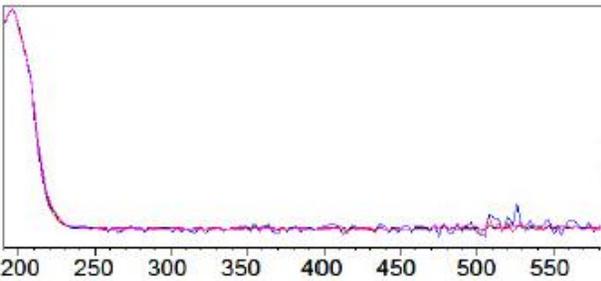
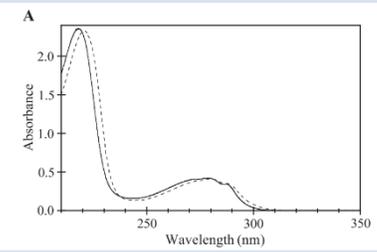
El proyecto de materia integradora realizado fue de carácter cuantitativo, ya que se ejecutaron diversos procesos y análisis a escala de laboratorio para la cuantificación de hormonas vegetales. A su vez, se consultó y recopiló datos e información de artículos científicos, libros, tesis académicas y páginas web con el propósito de mejorar los procedimientos descritos en el protocolo de extracción de fitohormonas por electroforesis capilar, propio del CIBE (CIBE,2022).

## 2.2 Selección de fitohormonas

A partir de referencias bibliográficas se seleccionó las fitohormonas que se identifican en el estudio teniendo en cuenta su disponibilidad.

**Tabla 5.**

*Información sobre fitohormonas seleccionadas*

Nombre	Grupo	Espectro UV	Fuente
<b>Kinetina</b>	Citoquininas		(Barciszewski, Rattan, Siboska, & Clark, 1999)
<b>Ácido Giberélico</b>	Giberelinas		(Quijano-Aviles, Gavica, Barragan, & Manzano, 2018)
<b>Ácido Indolacético (IAA)</b>	Auxinas		(Caric, y otros, 2004)

### 2.3 Comparación de diferentes métodos extractivos de fitohormonas en biomasa algal

En la Tabla 6, se resumió información sobre los diferentes métodos de extracción empleados para la obtención de compuestos bioactivos en bioestimulantes, incluyendo las fitohormonas de diversos estudios. Los parámetros de operación como presión, temperatura, solvente utilizado, cantidad de solvente consumido y tiempo de proceso son diferentes según el método.

**Tabla 6.**

*Comparación de los parámetros principales de los diferentes métodos de extracción*

Parámetros	Método tradicional		Método no tradicional		
	Extracción líquido-líquido	Extracción con álcalis	Fluido supercrítico CO <sub>2</sub>	Extracción asistida por Ultrasonido	Líquido presurizado
<b>Temperatura</b>	Ambiente	Superior al ambiente (70-100°C)	Superior al ambiente (>40°C)	Superior al ambiente (90°C)	Altas (200°C)
<b>Presión</b>	Atmosférica	Atmosférica	Presión elevada	Atmosférica/ Presión elevada	Presión elevada
<b>Solvente</b>	Agua, solventes orgánicos, acuosos y no acuosos	Solventes de carácter alcalino (KOH)	CO <sub>2</sub>	Cualquier solvente	Gran rango de solventes
<b>Solvente consumido</b>	Grande	Grande	Promedio	Baja	Promedio
<b>Tiempo de procesado</b>	Lento	Lento	Lento (>5h)	Bajo (90 min)	Lento
<b>Referencia</b>	(Michalak, 2014; Murillo & Romo, 2021)	(Murillo & Romo, 2021; González, 2022)	(Michalak, 2014; Michalak, 2016; Murillo & Romo, 2021)	(Michalak, 2014; Murillo & Romo, 2021)	(Michalak, 2014)

### 2.3.1 Elección del método extractivo

Para la elección del método extractivo, se debe considerar información esencial acerca de parámetros de extracción de las fitohormonas para contrarrestar con la Tabla 6 y discriminar la solución ideal. De la literatura, se encontró algunos parámetros para la extracción de fitohormonas que se detallan en la Tabla 7.

**Tabla 7.**

*Parámetros característicos en la extracción de fitohormonas*

<b>Parámetros</b>	
<b>Presión</b>	Ambiente
<b>Temperatura</b>	15°C-Ambiente
<b>Solventes</b>	Agua, etanol 50%, metanol 80%, ácido fórmico
<b>Polaridad del solvente</b>	Polar
<b>Estado final de la biomasa</b>	Extracto líquido
<b>Conservación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etanol al 15% - 20% + temperatura ambiente</li> <li>• Agua + conservar en lugar frio</li> </ul>
<b>Referencia</b>	(Gupta,2011; Murillo &Romo,2021)

## 2.4 Materiales y equipos

### 2.4.1 Muestras de *Ulva sp.* y *Acanthophora spicifera*

#### 2.4.1.1 Recepción y conservación de muestras

Las especies de *Ulva sp.* y *Acanthophora spicifera* fueron cosechadas en dos meses del año en Puerto El Morro y Playa San Pedro respectivamente. Tanto el cultivo y la cosecha de estas macroalgas estudiadas fueron parte de la materia integradora de estudiantes de Biología de la universidad. La cantidad receptada de la especie *Ulva sp.* y *Acanthophora spicifera* fue de 1 kg cada uno. Posterior a su recepción se conservaron las muestras bajo refrigeración en fundas herméticas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . En la Tabla 8 se muestra la información de la colecta.

**Tabla 8.**

*Información de recolección de macroalgas *Ulva sp.* y *Acanthophora spicifera**

<b>Especie</b>	<b>Fecha de cosecha</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Coordenadas</b>
<i>Ulva sp.</i>	01/09/2022	Puerto el Morro, Guayas, Ecuador.	2°38'05"S 80°19'33"O
<i>Acanthophora spicifera</i>	13/09/2022	Playa San Pedro, Santa Elena, Ecuador.	1°56'44"S 80°43'21"W

**Figura 1.**

*Macroalgas receptadas en el laboratorio*



#### 2.4.2 Reactivos

En la Tabla 9, se detalla los reactivos utilizados en el proyecto de la materia integradora:

**Tabla 9.**

*Lista de reactivos utilizados en los diferentes procesos y análisis*

Reactivos	Proceso/Análisis
Estándar de ácido indolacético	Curva de calibración
Estándar de ácido giberélico	Curva de calibración
Estándar de kinetina	Curva de calibración
Agua destilada	Todos los análisis
Metanol grado HPLC	Extracción de fitohormonas

<b>Ácido clorhídrico, HCl 1N</b>	Extracción de fitohormonas
<b>Hidróxido de sodio, NaOH 0.1N</b>	Extracción de fitohormonas
<b>Acetato de etilo</b>	Extracción de fitohormonas
<b>Acetonitrilo grado HPLC</b>	Cromatografía HPLC
<b>Agua grado HPLC</b>	Cromatografía HPLC
<b>Ácido fórmico 0.1%</b>	Cromatografía HPLC

### 2.4.3 Equipos

Los equipos utilizados en la extracción, identificación y cuantificación de ácido indolacético, ácido giberélico y kinetina se detallan a continuación:

El pesado de las muestras y diferentes reactivos sólidos se realizaron en una balanza analítica Marca ISOLAB con una capacidad de 220 g.

El almacenamiento de las muestras y extractos líquidos se dio en un refrigerador Marca Durex, con una temperatura mínima de -20°C. El secado en frío se realizó en el liofilizador Marca LABCONCO. Además, se utilizó un desecador de vidrio sin llave con cama desecante de gel de sílice para mantener las muestras de macroalgas libres de humedad luego de la liofilización.

La trituración de las biomásas se realizó en un molinillo eléctrico de granos de café Marca DAEWOO.

El proceso de digestión se dio en la campana extractora o Sorbona Marca BIOBASE, para evitar inhalar vapores del solvente. Adicionalmente, en este proceso se hizo uso de una plancha calefactora con agitación magnética Marca IKA, Modelo RCT basic con temperatura máxima de 250°C. La homogenización de muestras de manera rápida se dio en el sonicador Marca VWR.

Para recuperar el solvente utilizado en la extracción y secar a totalidad se utilizó un rotaevaporador Marca Heidolph, Modelo Laborota 4100 series con un serpentín de vidrio Marca Heidolph,

El ajuste de pH con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio se hizo en un pHmetro Marca Oakton, Modelo Ion 510 con funciones extras como Ion/mV/Temperature meter.

Posterior al ajuste de pH, se realizó agitación constante de las muestras en un zarandeador/vibrador marca New Brunswick Scientific, modelo INNOVA 44.

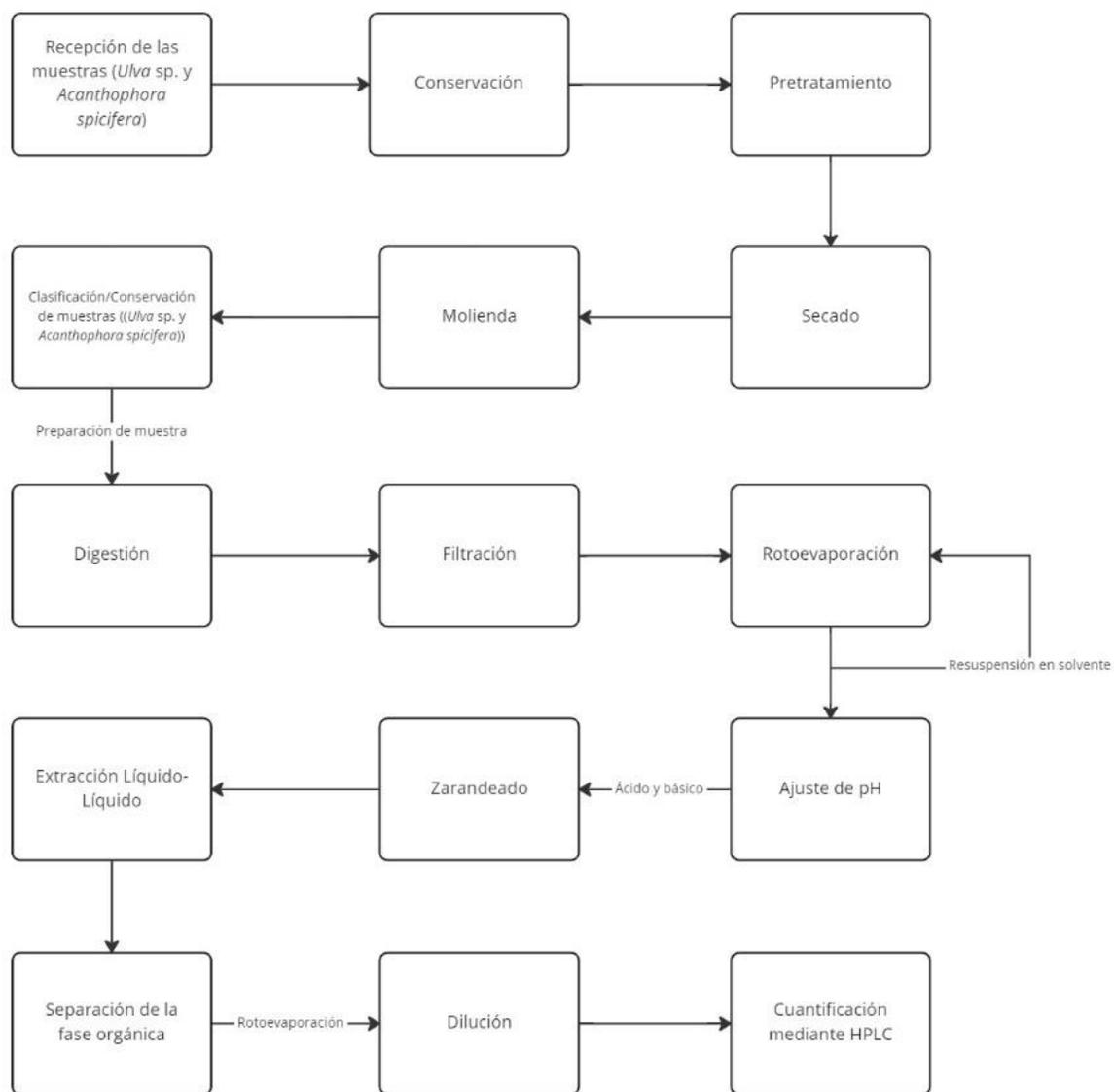
La cuantificación de fitohormonas en los extractos de macroalgas se realizó en un equipo con Sistema: HPLC-UV, Marca Waters, Modelo Arc HPLC. Equipado con: inyector automático, bomba cuaternaria, Detector UV. Los datos fueron interpretados con el Software Empower™ 3.

## **2.5 Esquema de trabajo**

El esquema de trabajo para este proyecto se describe a continuación. Ver Figura 2

**Figura 2.**

*Esquema de trabajo en la extracción, identificación y cuantificación de GA3, AIA y KIN*



La extracción de fitohormonas en macroalgas se realizó en base a extracción en matrices sólidas del protocolo CBE-PROT-BP XXX del CIBE (2022) utilizando como método de cuantificación la electroforesis capilar.

### 2.5.1 Condiciones instrumentales para el HPLC

A continuación, se muestra una tabla con las condiciones establecidas para analizar las muestras en el equipo HPLC:

**Tabla 10.**

*Condiciones instrumentales para análisis de muestras en el HPLC*

<b>Condiciones instrumentales</b>	
<b>Software</b>	Empower 3
<b>Fase móvil</b>	Acetonitrilo
<b>Solventes</b>	Ácido fórmico 0.1%
<b>Temperatura de la columna</b>	25°C
<b>Temperatura de la muestra</b>	20°C
<b>Longitud de onda para Ácido Giberélico (GA3)</b>	195 nm
<b>Longitud de onda para Ácido Indolacético (AIA) y Kinetina (KIN)</b>	278 nm

### 2.5.2 *Curva de calibración*

La curva de calibración es un gráfico que se obtiene a partir de la inyección del componente que se requiere cuantificar usando alícuotas a diferentes concentraciones. De esta forma, al conocer las concentraciones de las muestras (alícuotas) se construye la curva de calibración considerando la concentración de la solución de calibración o estándar vs el área del pico obtenido. A partir de la curva de calibración de cada compuesto se podrá cuantificar el estándar en el analito o muestra de interés. (Sottofattori, Anzaldi, & Ottonello, 2001)

Para el presente trabajo de investigación se realizaron 6 estándares del mix que corresponde a la muestra que contiene las tres fitohormonas a analizar más la inyección del “BLANCO” que sirve como referencia del solvente puro (MeOH grado HPLC). Las concentraciones que se eligieron para la construcción de la curva de cada estándar fueron: 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 25 ppm y 50 ppm.

La obtención de los estándares se obtiene a partir de un estándar individual de cada fitohormona con una concentración de 1000 ppm. Para realizar esto se disolvió 1 mg de fitohormona en 1 mL de solvente puro obteniendo tres estándares concentrados. Posteriormente se mezclaron los estándares para obtener un mix de 250 ppm. Esto fue posible usando 0.5 mL de cada estándar concentrado a 1000 ppm y añadiendo finalmente 0.5 mL de solvente puro. Finalmente, los 2 mL del mix que se obtiene es de 250 ppm.

Para obtener 1 mL de cada alícuota se añadió metanol grado HPLC hasta obtener la concentración requerida. A continuación, se muestra la Tabla 11 con las diluciones realizadas.

**Tabla 11.**

*Diluciones de estándar realizadas para la curva de calibración*

<b>Concentración del estándar</b>	<b>Volumen añadido de mix 250 ppm</b>	<b>Volumen añadido de MeOH grado HPLC</b>
<b>1 ppm</b>	4 uL	996 uL
<b>5 ppm</b>	20 uL	980 uL
<b>10 ppm</b>	40 uL	960 uL
<b>15 ppm</b>	60 uL	940 uL
<b>25 ppm</b>	100 uL	900 uL
<b>50 ppm</b>	200 uL	800 uL

Los seis estándares y el blanco se inyectaron en el HPLC luego de filtrar y colocarlos en los viales. Los resultados obtenidos fueron los puntos de concentración y área del pico por fitohormona. En la curva de calibración un factor  $R^2$  cercano a uno muestra que los datos no están dispersos y por lo tanto representa un buen ajuste lineal para la lectura de muestras y cuantificación de fitohormonas.

### 2.5.3 *Pretratamiento de la muestra*

Según Michalak (2014), se puede considerar el pretratamiento de la biomasa en dos aspectos: limpieza y secado/molido. El primer paso consiste en un lavado a fondo de la biomasa con agua (luego de su cosecha) para eliminar partículas e impurezas de arena adheridas. El siguiente paso consiste en la homogenización de la muestra para que aumente su relación superficie-volumen. Para ello se requiere secar la biomasa para luego pasar por un proceso de trituración. En el secado de algas, resaltan dos métodos: la liofilización (a 253.15 K por varios días) o secado a temperatura baja (35°C) para evitar comprometer la muestra por degradación de termolábiles compuestos. La molienda se da manualmente o usando un molinillo mecánico o una licuadora. Al final, se tamiza la muestra hasta obtener el tamaño apropiado (Michalak, 2014).

En nuestro proyecto, se realizó una limpieza manual antes del lavado con abundante agua destilada, ya que las muestras contenían elementos no deseados que el lavado con agua no retira como ramas, piedras, lodo, crías de decápodos y crustáceos. Para la liofilización, se acopló las muestras, tanto de *Ulva* sp. como de *Acanthophora spicifera*, en los recipientes del equipo al formar esferas para mejor manejo y conservación, pues el secado no se hizo de inmediato luego de su limpieza. Este proceso tomó aproximadamente 5 días y se trituró con un molinillo eléctrico de granos de café. Se realizó múltiples del molinillo ante el cambio de macroalga a triturar y se taparon los espacios del equipo con papel aluminio.

**Figura 3.***Pretratamiento de las muestras*

Nota. A) Limpieza manual de muestra de *Ulva* sp.; B) Muestra limpia de *Ulva* sp.; C) Muestra limpia de *Acanthophora spicifera*; D) Muestra de *Ulva* sp. acondicionada para el liofilizador; E) Muestra de *Ulva* sp. dentro del liofilizador; F) Muestra de *Acanthophora spicifera* dentro del liofilizador. G) Trituración de *Acanthophora spicifera*.

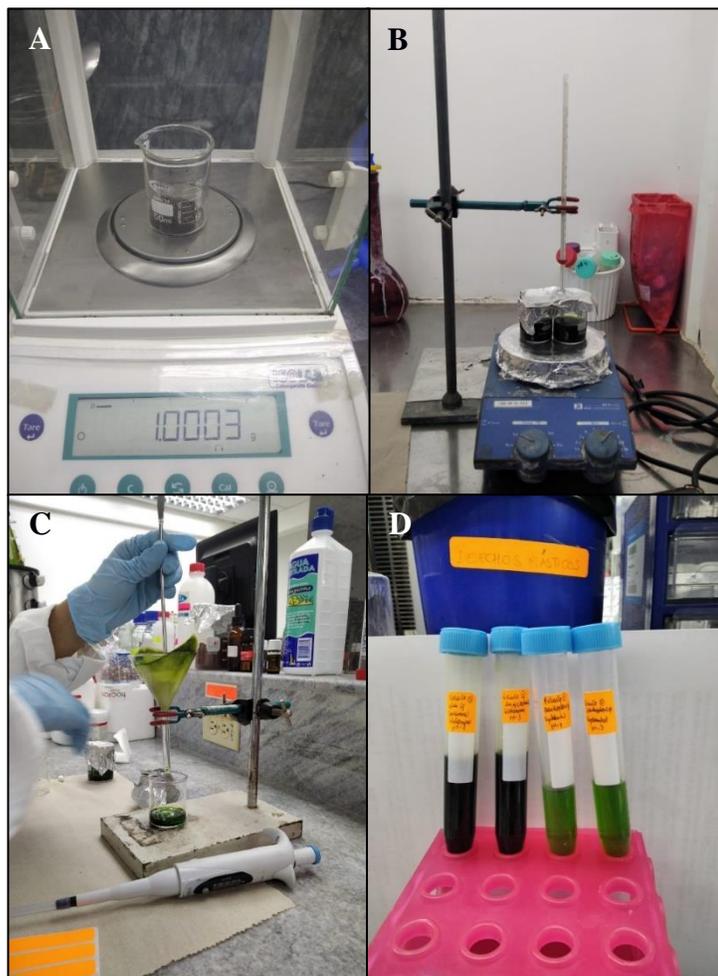
#### 2.5.4 Preparación de la muestra

Se pesaron aproximadamente 1 g de la muestra de macroalga seca en un vaso de precipitación de 50 mL. Se agregaron 25 mL de metanol grado HPLC previamente filtrado y se lo puso a digerir durante 45 minutos a 47°C, se colocó un agitador magnético acorde al recipiente y se mantuvo agitación constante.

Se armó un sistema de filtración por gravedad con un soporte universal y agarraderas o aros de calentamiento. La filtración se dio luego de un corto reposo del extracto. Se recogió el líquido en tubos de plástico Falcon de 15 mL. Se hicieron lavados con metanol grado HPLC previamente filtrado con la biomasa restante en el vaso. Se recolecta dos tubos Falcon con mismo volumen del proceso de filtración, que servirán para el ajuste de pH ácido y básico.

**Figura 4.**

*Preparación de las muestras*



Nota. A) Pesado de *Acanthophora spicifera*; B) Sistema de digestión de *Ulva* sp.; C) Sistema de filtración de *Ulva* sp.; D) Separación de submuestras de *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera*

Se pone a rotoevaporar las muestras hasta sequedad. Se resuspende el extracto seco con cantidades pequeñas ( $\mu\text{L}$ ) de metanol grado HPLC previamente filtrado y se llevó a tubos eppendorf para rotoevaporar de nuevo hasta sequedad. Se preparó agua acidificada con ácido clorhídrico 1 N y agua alcalina con hidróxido de sodio 0.1 N. Se ajusto el pH de una submuestra con 400  $\mu\text{L}$  de agua acidificada (submuestra ácida) y la otra con 400  $\mu\text{L}$  de agua alcalina (submuestra básica). Se agrego a ambas submuestras 1.2 mL de acetato de etilo. Se llevó al zarandeador/vibrador a 120 rpm, 5°C por una hora.

Luego, se dejó reposar las submuestras hasta que se observó separación de fase y se extrajo la fase orgánica en otro tubo eppendorf previamente pesado. Se repitió el proceso de rotoevaporación hasta sequedad y se pesó el tubo eppendorf. Se resuspendió las submuestras en 1 mL de metanol grado HPLC previamente filtrado. Se utilizó un microfiltro de 0.2  $\mu\text{m}$  y una jeringa en el transvase del tubo eppendorf a viales de HPLC de 2 mL. Finalmente, se inyectó las submuestras en el HPLC para su lectura y cuantificación de fitohormonas. El procedimiento se hizo por triplicado para ambas algas.

**Figura 5.**

*Preparación de las muestras (continuación)*



Nota. E) Rotoevaporación de submuestra *Acanthophora spicifera*; F) Submuestras rotoevaporadas de *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera*

**Figura 6.**

*Preparación de las muestras (continuación)*



Nota. G) Submuestras de *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* en el zarandeador/vibrador; H) Fases separadas de submuestra de *Acanthophora spicifera*; I) Rotoevaporación de fase orgánica de submuestra de *Ulva* sp.; J) Submuestras de *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* listas para inyección.

## **2.6 Análisis de costos: Diseño de planta como propuesta para extracto de macroalgas**

Para el análisis de costo se realizó el diseño de una planta industrial para la propuesta de un bioproducto, en este caso se escogió un bioestimulante. Para ello se investigó las diferentes tecnologías extractivas de fitohormonas a nivel industrial de documentos en línea, tesis académicas y libros universitarios. Las tecnologías de escalado más frecuentes encontrados fueron extracción por fluido supercrítico CO<sub>2</sub>, extracción asistida por microondas, extracción sólido-líquido y extracción por líquido presurizado. La elección del método dependió de las condiciones de operación ideales en la extracción del metabolito de interés.

En la figura 7, se detalla el proceso de la planta para la producción de extracto bioestimulante. Este proceso se basó en el diseño de una planta piloto para la extracción de bioestimulante y K-carragenina a partir de una macroalga roja enfocado en el sector agrícola (Murillo&Romo, 2021).

**Figura 7.**

Diagrama de bloques del proceso de extracción



Se recolectó información de los equipos requeridos para la tecnología de la planta como lo son las dimensiones, material, capacidad, voltaje, potencia y costo estimado. Además, se analizó la cantidad de equipos, consumo energético, consumo y costo estimado de reactivos y materia prima y se utilizó los resultados de la cuantificación realizada en el laboratorio. Toda esta información es usada para la proyección de rentabilidad de la planta propuesta.

### **2.6.1 Elección de la tecnología de la planta a diseñar**

La tecnología escogida debe trabajar bajo las condiciones adecuadas para el extracto bioestimulante. De las exploradas, se descarta la extracción asistida por microondas y la extracción por líquido presurizado debido a que no son ideales para

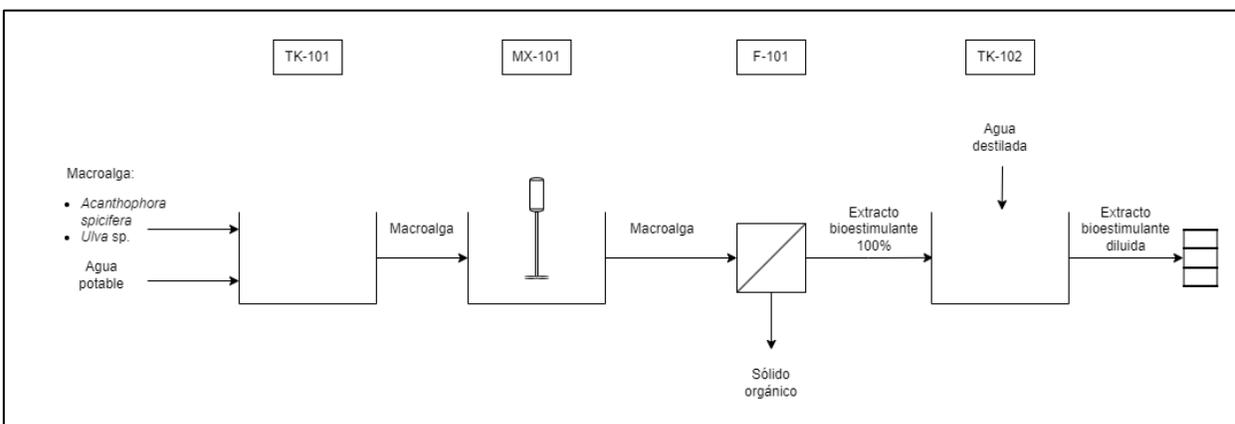
metabolitos termosensibles como lo son las fitohormonas que trabajan con temperaturas cercanas al ambiente. La extracción sólido-líquido puede adecuarse a las restricciones del extracto. Sin embargo, su alto requerimiento de solvente para las grandes cantidades de materia prima trabajadas a nivel industrial presenta un inconveniente económico por su alto costo (dependiendo del solvente) y un alto impacto a la hora de diseñar con tecnologías eco amigables. La extracción por fluido supercrítico CO<sub>2</sub> presenta ventajas sobre otros métodos extractivos, aunque su costo de inversión es demasiado alto y necesita un co-solvente para compuestos polares que resulta limitado en ciertas mezclas binarias (Michalak, 2014).

Entre los métodos que presentan parámetros tolerables están la extracción por maceración y la extracción asistida por ultrasonido. La primera es descartada por su alto uso de solvente y alto tiempo de operación. La segunda requiere pequeñas cantidades de solvente, presenta buena afinidad con otros métodos extractivos y es ideal para la extracción de metabolitos termosensibles (Michalak, 2014). No obstante, no será la tecnología escogida, aunque Murillo & Romo (2021) sugieren su implementación en el proceso luego de la homogenización por la alta selectividad y un alto rendimiento que teóricamente puede brindar (Michalak, 2014). Finalmente, la tecnología escogida es una adaptación de extracción por sólido-líquido con agitación para la obtención de un extracto concentrado que posteriormente pasa por una dilución y así tener un producto final.

## 2.6.2 Descripción de proceso de la planta escala como propuesta de bioestimulante

**Figura 8.**

*Diagrama de flujo de proceso de la propuesta de planta*



La planta propuesta se observa en la Figura 8 y es planteada según diferentes fuentes bibliográficas en la que destaca Eswaran (2005) y se describe a continuación:

Las macroalgas *Acanthophora spicifera* y *Ulva sp.* son lavadas en el tank 101 con agua potable a temperatura ambiente con el fin de eliminar materia no deseada como impurezas (arena, lodo, rama), decápodos y crustáceos en etapa inicial atrapados en la materia orgánica.

Después del lavado, la biomasa se homogeniza en el mixer 101 hasta obtener un lodo orgánico. El tiempo de este paso puede tardar desde una hora en adelante. El lodo orgánico pasa por los filtros de manga para su filtración por gravedad, esto se considera el filter-101, en donde el líquido recolectado en un recipiente representa el extracto

bioestimulante concentrado. El sólido orgánico sobrante en los filtros es retirado para la limpieza y almacenado en otro recipiente.

El extracto bioestimulante concentrado pasa a ser la solución madre para la dilución en el tank 102. Aquí la solución madre se mezclará con agua destilada en una proporción determinada que dependerá del porcentaje de dilución buscado para el producto. Al final, se obtendrá un extracto bioestimulante diluido a 7.5%, en donde cada 7.5 partes de solución madre se diluirá con 92.5 partes de agua destilada. Este líquido se almacena para su envase y comercialización.

# CAPÍTULO 3

## 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 3.1 Identificación de fitohormonas

#### 3.1.1 *Curvas de calibración*

La elección de las concentraciones para la curva de calibración se basó en los reportes de fitohormonas en macroalgas donde se evidenció que las concentraciones de fitohormonas son muy bajas. El rango de las concentraciones que reportan Gupta (2011) y García (2020) va desde 0.049 mg/kg hasta 4.93 mg/kg para *Ulva* sp. Mientras que, para la macroalga *Acanthophora spicifera* Guillen (2022) reporta presencia de fitohormonas desde 15.3 mg/kg hasta 157 mg/kg. Sin embargo, este artículo muestra el total de fitohormonas para los grupos: citoquininas y giberelinas respectivamente mas no de forma individual kinetina y ácido giberélico. Debido a los estudios antes mencionados se eligieron seis alícuotas desde 1 ppm hasta 50 ppm del patrón que contiene las tres fitohormonas a ser analizadas.

##### 3.1.1.1 *Identificación y curva de calibración de Ácido Giberélico*

A partir de las distintas diluciones del patrón de fitohormonas (mix) inyectadas en el equipo cromatográfico se obtuvieron los resultados del área bajo el pico del cromatograma de Ácido Giberélico para cada concentración. Los datos se muestran en la Tabla 12 siendo el software Empower™ 3 el utilizado para obtener la data.

**Tabla 12.**

*Resultados HPLC (GA3) de la corrida de las disoluciones del patrón mix*

<b>Concentración [ppm]</b>	<b>Área</b>
<b>1</b>	9932.85973
<b>5</b>	24910.27536
<b>10</b>	38737.43549
<b>15</b>	46875.26727
<b>25</b>	87533.22224
<b>50</b>	178849.84050

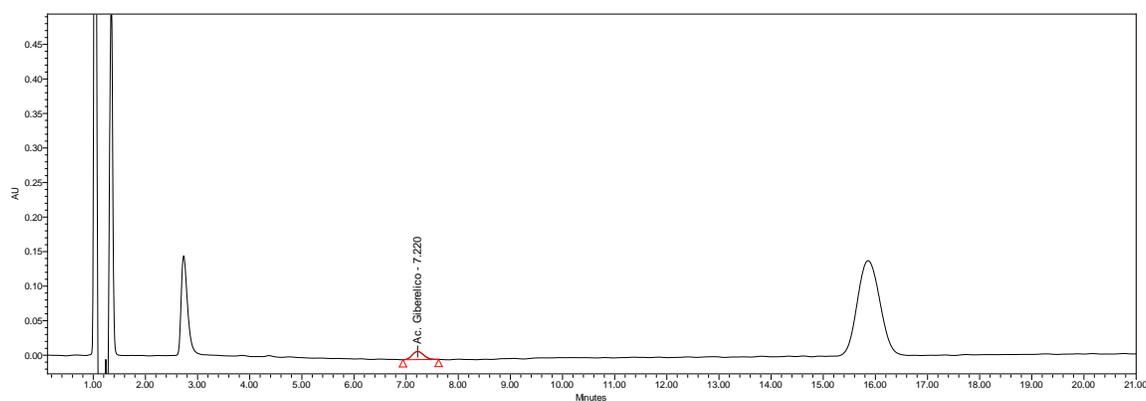
Respecto a estudios reportados sobre detección y cuantificación de Ácido Giberélico mediante HPLC se puede mencionar el artículo “Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing *Fusarium* strains” donde muestran el espectro UV del ácido giberélico de la Tabla 5. En este estudio se observa el cromatograma para una concentración de 1 ppm de la solución patrón y se reporta un tiempo de retención para el ácido giberélico de 3.651 [min]. En el estudio se usa otra fase estacionaria (LiChrospher en columna empacada de acero inoxidable RP-18), fase móvil (acetonitrilo) y como solvente agua acidificada (0.01% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) obteniendo el espectro UV a una longitud de onda de 206 nm (Bhalla et al., 2010).

El cromatograma del Ácido Giberélico obtenido mediante cromatografía HPLC para el presente estudio se muestra en la Figura 9 a una concentración de 50 ppm

empleando acetonitrilo como fase móvil y la solución acuosa de ácido fórmico al 0.1% como solvente. En este caso, diferente al estudio en cepas *Fusarium strains*, el cromatograma se hace visible para una longitud de onda de 195 nm con un tiempo de retención de  $t_r = 7.22 \text{ min}$  y un área integrada bajo el pico de 178849.84050. La diferencia en el tiempo de retención del compuesto se debe a la diferencia de fase móvil y fase estacionaria lo que hace que el cromatograma se desplace. Por otro lado, la diferencia en la longitud de onda entre los dos estudios se debe a parámetros del medio como temperatura y pH (Abril, 2010).

### Figura 9.

#### Cromatograma del ácido giberélico

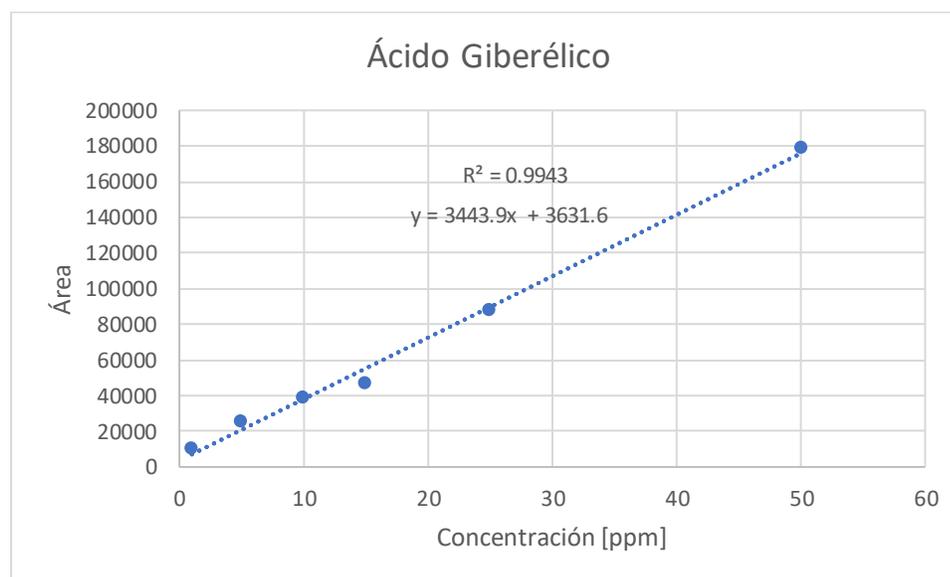


Los tiempos de retención para las concentraciones del patrón de fitohormonas (mix) a 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm y 25 ppm fueron x, x, x, x, x siendo estos valores relativamente cercanos. A partir de estos tiempos de retención del patrón se define que, para cada muestra de extracto de macroalga (*Ulva* sp. y *Acanthophora Spicifera*), se analiza el ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) en un rango de 7.165-7.372 [min].

Para obtener la curva de calibración del ácido giberélico se realizó un análisis lineal de los resultados de concentración vs área integrada bajo el pico. En la Figura 10, se muestra la linealidad de los puntos con un nivel de coeficiente de determinación de 0.9943. La línea de tendencia es una ecuación lineal que relaciona la concentración del patrón con el área bajo el pico integrada. De acuerdo con la curva obtenida para el ácido giberélico se determinó la ecuación de la recta  $y = 3443.9x + 3631.6$ .

**Figura 10.**

*Curva de calibración del ácido giberélico*



### 3.1.1.2 Curva de calibración Ácido Indolacético

A partir de las distintas diluciones del patrón de fitohormonas inyectadas en el equipo HPLC se obtuvieron los resultados del área bajo el pico del cromatograma de

Ácido Indolacético o AIA para cada concentración. Los datos se muestran en la Tabla 13 siendo el software Empower™ 3 el utilizado para obtener la información.

**Tabla 13.**

*Resultados HPLC (AIA) de la corrida de las disoluciones del patrón mix*

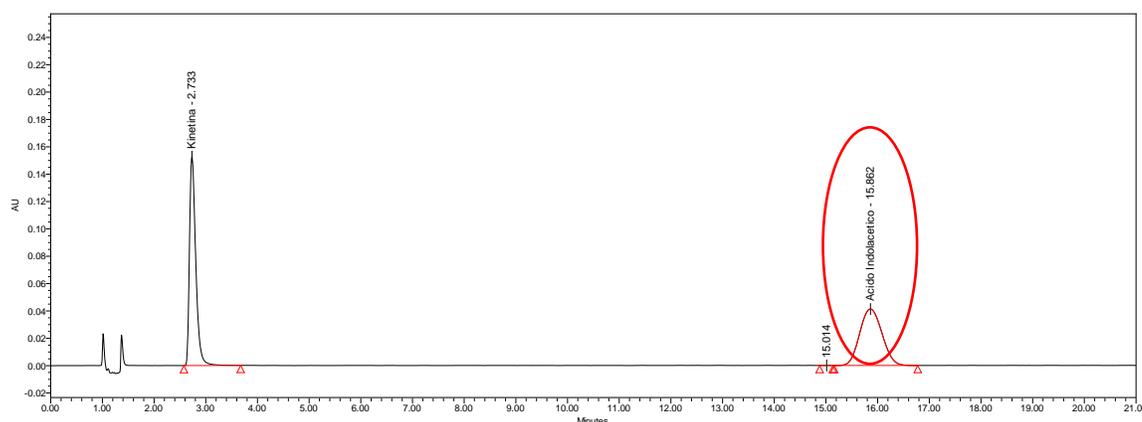
<b>Concentración [ppm]</b>	<b>Área</b>
<b>1</b>	19649.42499
<b>5</b>	117557.97000
<b>10</b>	230364.49010
<b>15</b>	367485.9211
<b>25</b>	645818.8157
<b>50</b>	1232091.64300

Referente a la detección y cuantificación de ácido indolacético se ha reportado el artículo “Un método simple para la determinación simultánea por RP-HPLC de compuestos indólicos relacionados con la biosíntesis bacteriana del ácido indol-3-acético”. Para este estudio las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna C-8 como fase estacionaria, eluente A que consistió en agua acidificada con ácido acético y ajuste de pH a 3.8 y como eluente B acetonitrilo en proporción 80:20 % (v/v) acetonitrilo:agua. El flujo fue de 1 mL/min con 20 uL de inyección de analito(Szkop & Bielawski, 2013) . El ácido indolacético pudo ser identificado a una longitud de onda de 280 nm con un tiempo de retención de 13.8 min.

Para la detección de ácido indolacético del presente estudio se estableció una longitud de onda de 278 nm y se obtuvo un tiempo de retención de 15.862 min. El desplazamiento en el tiempo de retención, en comparación con el estudio antes mencionado, se debe al uso de otra fase estacionaria. La cadena C-8 es menos retentiva que la cadena C-18 por lo que en la columna del estudio de Szkop & Bielawski (2013) se reduce el tiempo de análisis (Henderson, 2006). Respecto a la longitud de onda esta no varía mucho en comparación con el estudio puesto que el parámetro que afecta es el pH siendo 3.8 para el estudio de Szkop & Bielawski, y 4 para el estudio de fitohormonas en macroalgas *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera*. El cromatograma correspondiente al ácido indolacético se presenta a continuación como la Figura 11.

### Figura 11.

#### *Cromatograma del ácido indolacético*

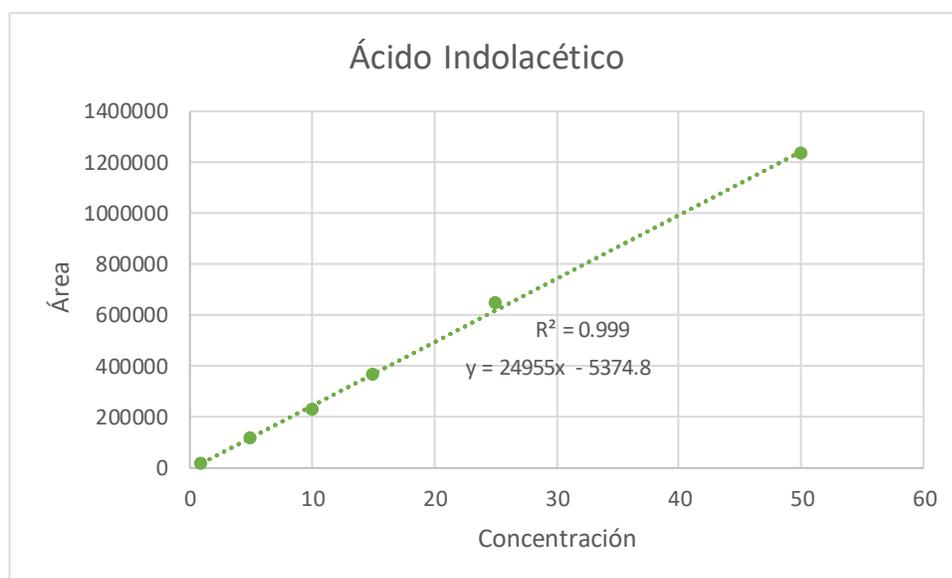


La obtención de la curva de calibración para el ácido indolacético se realizó a partir de un análisis lineal de los resultados de concentración del patrón vs área integrada bajo el pico del cromatograma. En la Figura 12 se muestra la linealidad de los puntos con un R-cuadrado de 0.999 lo que indica el carácter lineal de la curva de calibración. Así

mismo, se obtuvo la curva para el AIA que relaciona la concentración con el área bajo el pico con la ecuación de la recta  $y = 24955x - 5374.8$ . Sin embargo, la ecuación de la curva de calibración sólo es válida para valores numéricos de concentración mayores a 0.21 ppm.

**Figura 12.**

*Curva de calibración del ácido indolacético*



**3.1.1.3 Curva de calibración Kinetina**

La curva de calibración de kinetina se graficó a partir de los datos reportados por el equipo HPLC de las alícuotas del mix de fitohormonas. En la Tabla 14, se muestra los

resultados del área integrada para cada concentración obtenidos desde el software Empower™ 3.

**Tabla 14.**

*Resultados HPLC (KIN) de la corrida de las disoluciones del patrón mix*

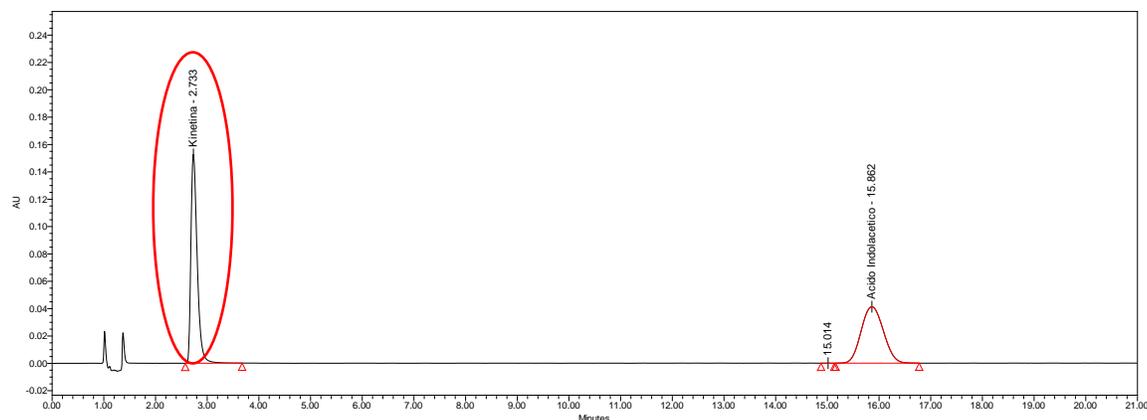
Concentración [ppm]	Área
1	23931.75987
5	131294.73060
10	250468.94110
15	389255.31190
25	680688.00910
50	1289317.39600

Respecto a información cromatográfica sobre kinetina se puede mencionar el artículo “Simultaneous determination of nine phytohormones in seaweed and algae extracts by HPLC-PDA” donde reporta el tiempo de retención para la kinetina de 3.316 min (Górka & Wieczorek, 2017) mientras que para este estudio se identifica un tiempo de retención de 2.733 min. Entre las diferencias de los estudios que justifican el desplazamiento del cromatograma se puede mencionar el uso de una columna diferente. Górka (2017) reporta resultados usando una columna C-18 de dimensiones 5µm, 4.6x150 mm mientras que para la cuantificación en macroalgas *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* se usó una columna C-18 con dimensiones 3.5 µm, 4.6x100 mm. La longitud de onda definida en el artículo para la detección de las fitohormonas fue de 214 nm mientras que

para nuestro estudio es de 272 nm. A pesar de que el pH del solvente de la fase móvil se estableció a 4, la temperatura de las columnas no fueron las mismas siendo 25°C para el análisis de los extractos y 35°C para la cuantificación de fitohormonas en macroalgas (Górka & Wieczorek, 2017). A continuación, en la Figura 13 se muestra el cromatograma de la kinetina donde se puede visualizar la forma del espectro y el tiempo de retención para una concentración de 50 ppm.

### Figura 13.

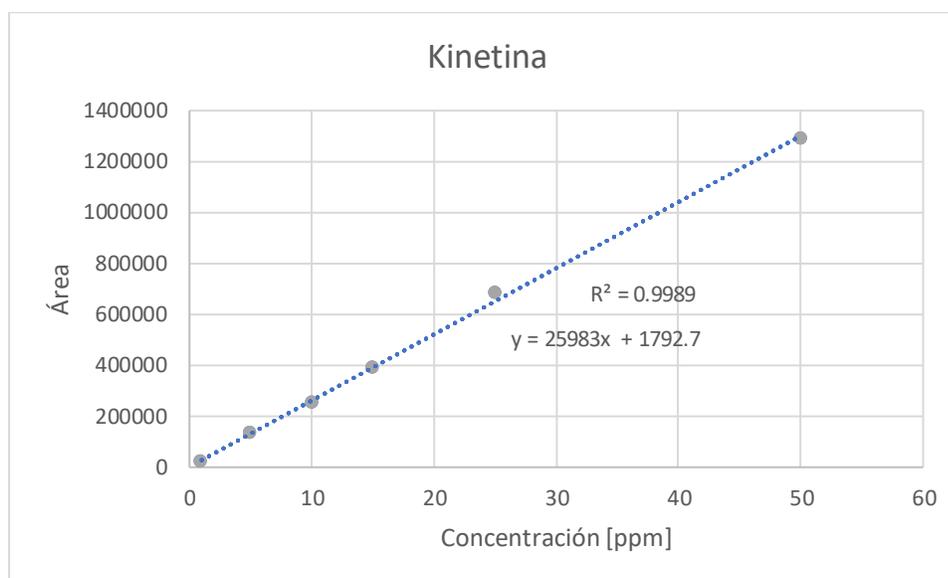
#### *Cromatograma de la kinetina*



Para la obtención de la curva de calibración se ingresaron los datos de concentración vs área integrada bajo el pico del cromatograma de kinetina. En la Figura 14, se muestra la linealidad de los puntos con un coeficiente de determinación de 0.9989 demostrando que el modelo de regresión lineal se ajusta a los datos reales. La ecuación de la curva de calibración  $y = 25983x + 1792.7$  también se obtuvo a partir de este análisis.

**Figura 14.**

*Curva de calibración de la kinetina*



### 3.2 Cuantificación de Fitohormonas

Dentro del análisis de cuantificación se consideran los resultados de las concentraciones de fitohormonas en los meses de septiembre (2022) y enero (2023) para las macroalgas *Ulva sp.* y *Acanthophora Spicifera*. Además, se realiza una comparación de resultados respecto a otros estudios de fitohormonas en las mismas macroalgas, pero en diferentes ubicaciones geográficas y tiempos de cosecha.

#### 3.2.1 Cuantificación de fitohormonas en *Ulva sp.*

A partir de las curvas de calibración de las fitohormonas kinetina (KIN), ácido indolacético (AIA) y ácido giberélico (GA3) se obtuvo la concentración de fitohormonas de las muestras analizadas. Para garantizar la validez del estudio se analizaron las

muestras por triplicado reportando los datos con su respectiva desviación estándar. En el Apéndice A se muestran los cromatogramas para cada muestra de *Ulva* sp. en los dos meses de cosecha. A continuación, la Tabla 15 resume los datos obtenidos a partir del análisis cromatográfico y estadístico.

**Tabla 15.**

*Cuantificación de fitohormonas en Ulva sp.*

Fitohormona [mg/kg]	Meses de cosecha de <i>Ulva</i> sp.	
	Septiembre (2022)	Enero (2023)
<b>KIN</b>	2.00±0.81	N/D
<b>AIA</b>	13.24±3.37	6.70±0.03
<b>GA3</b>	20.79±4.31	8.55±0.86

Como se puede visualizar en la tabla, la concentración de fitohormonas es mayor en la cosecha de septiembre. En la Tabla 16, se muestran las condiciones meteorológicas para los meses del ciclo de cultivo. Es necesario mencionar que las macroalgas se cultivaron en ciclos de 21 días, por lo que, la materia prima cosechada el 1 de septiembre fue cultivada a inicios del mes de agosto mientras que la cosechada el 16 de enero inicia su ciclo de cultivo a finales de diciembre. De acuerdo con las condiciones meteorológicas se puede considerar el mes de agosto como un mes de estación seca y los meses de diciembre (2022) y enero (2023) como meses pertenecientes a la estación lluviosa.

**Tabla 16.**

*Condiciones meteorológicas en el mes de agosto y septiembre de 2022 y enero de 2023 en Guayaquil*

Mes de cultivo	Datos meteorológicos en Guayaquil		
	Temperatura promedio	Temperatura promedio del agua	Tiempo
Agosto (2022)	21°C - 29°C	22°C	Niebla
Diciembre (2022)	23°C - 31°C	24°C - 25°C	Lluvia ligera, lluvia fuerte y neblina
Enero (2023)	24°C - 31°C	25°C - 26°C	Lluvia (ligera, moderada y fuerte) y neblina

Nota. Datos tomados de la página web Weather Spark

(<https://es.weatherspark.com/h/m/19346/2023/1/Tiempo-hist%C3%B3rico-en-enero-de-2023-en-Guayaquil-Ecuador#Figures-Temperature>)

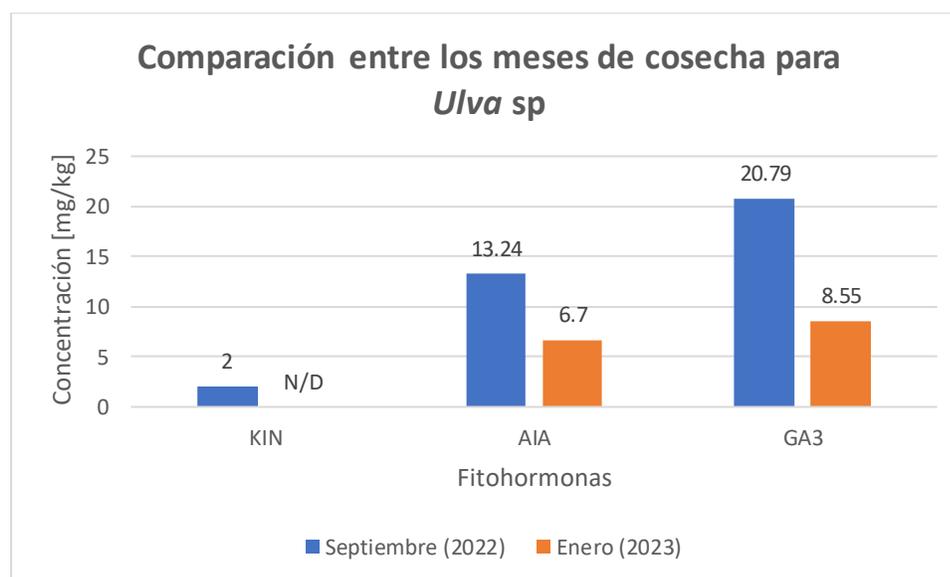
Gracias a la cuantificación de fitohormonas en el alga *Ulva* sp. para las dos estaciones del año, se determinó que la estación que favorece la presencia de fitohormonas en la macroalga es la estación seca. Entre los parámetros que inciden en la presencia de fitohormonas se pueden mencionar: la temperatura del agua, la temperatura promedio y el tiempo meteorológico. De acuerdo con el artículo “Respuestas fisiológicas y crecimiento de *Ulva* sp. ante la variación en las condiciones de su cultivo en estanques comerciales” los cambios de temperatura durante el ciclo de cultivo provocan estrés abiótico reduciendo las tasas fotosintéticas y por lo tanto disminuyendo el crecimiento de la macroalga (Revilla-Lovano et al., 2021). Como se puede ver en la Tabla 16, el mes de agosto mantuvo una temperatura del agua promedio mientras que en

los meses de diciembre enero existió más variación. Entre otros factores que se pudieron considerar para el estudio están los parámetros del agua como pH, alcalinidad, salinidad y presencia de metales en el agua de Puerto el Morro, pero el alcance del proyecto no lo contempla.

A continuación, en la Figura 15 se presenta el gráfico de barras correspondiente a la concentración de fitohormonas reportada para cada mes de cosecha. Se puede visualizar que existe una producción del 100% para la macroalga del mes de septiembre.

**Figura 15**

*Comparación de muestras de *Ulva sp.* analizadas en dos meses diferentes*



### 3.2.1.1 Cuantificación de fitohormonas en *Ulva sp.* vs otros estudios

A pesar de la disminución de concentración de fitohormonas en la cosecha del mes de enero para *Ulva* sp., los resultados continúan siendo superiores que los reportados en otras ubicaciones geográficas como se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17.**

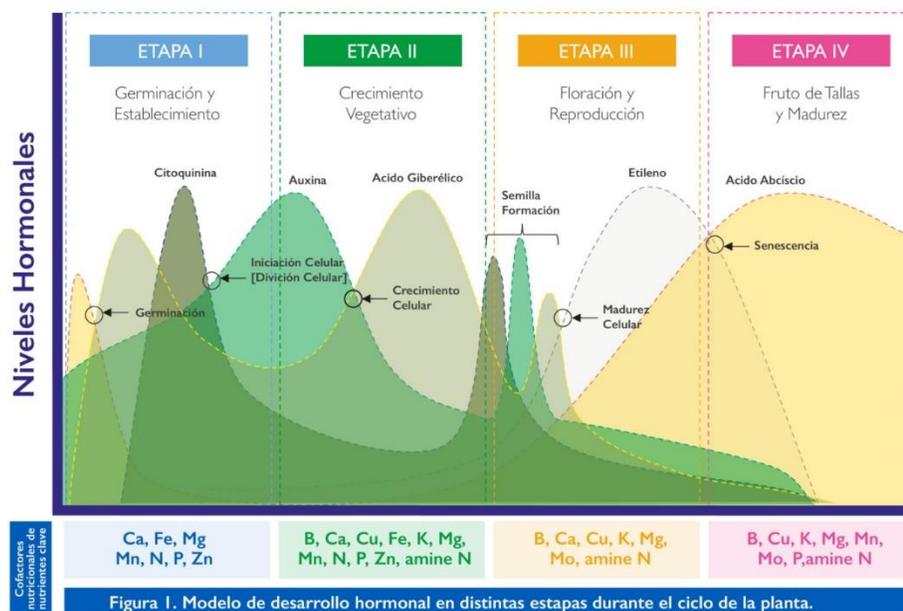
*Comparación de fitohormonas en Ulva sp. cuantificadas con estudios de otros países.*

Fitohormona	<i>Ulva sp</i>			
	Experimentación		Reportado	Reportado
	Septiembre (2022)	Enero (2023)	(Gupta et al., 2011)	(García et al., 2020)
<b>KIN [mg/kg]</b>	2.00 ± 0.81	N/D	0.61 ± 0.35	N/D
<b>AIA [mg/kg]</b>	13.24 ± 3.37	6.70 ± 0.03	4.93 ± 0.23	0.049 ± 0.005
<b>GA3 [mg/kg]</b>	20.79 ± 4.31	8.55 ± 0.86	1.19 ± 0.58	N/D

Gupta (2011) reporta las tres fitohormonas analizadas en el estudio, aunque sus concentraciones son menores a 5 mg/kg. La ubicación geográfica donde se llevó a cabo la investigación de Gupta fue India por medio de HPLC. Para el procedimiento una de las grandes diferencias es que la fase móvil usada en dicho estudio es única mientras que para este trabajo fue binaria (acetonitrilo y ácido fórmico 0.1%). Otros factores influyentes son las condiciones del medio y el tiempo de cultivo para la macroalga *Ulva* sp. También reporta que para el análisis se recolectaron algas jóvenes de Veraval, situado en la costa oeste de la India. En general, de acuerdo con bibliografía, es una zona donde existe variación de temperatura promedio de 6.5 C. Al mencionar que se recolectaron algas jóvenes se puede inferir que el punto de producción de fitohormonas en las macroalgas no era el óptimo. La producción de fitohormonas se da en cada etapa de crecimiento, como se muestra en la Figura 16.

**Figura 16.**

*Modelo de desarrollo hormonal en las distintas etapas durante el ciclo de vida de la planta*



Nota. Tomado de STOLLER US. (<https://agriculturers.com/revisa-el-funcionamiento-de-auxinas-giberelinas-y-citocininas/>)

### 3.2.2 Cuantificación de fitohormonas en *Acanthophora spicifera*

A partir de las curvas de calibración de las tres fitohormonas cuantificadas en este estudio (KIN, AIA, GA3) se obtuvo la concentración de fitohormonas de las muestras analizadas de *Acanthophora spicifera*. El análisis se llevó a cabo por triplicado con el fin de expresar la desviación estándar correspondiente. En el Apéndice B, se muestran los cromatogramas para las muestras de septiembre (2022) y enero (2023). En la Tabla 18, se resumen los resultados del análisis en el equipo cromatográfico.

**Tabla 18.***Cuantificación de fitohormonas en Acanthophora spicifera*

Fitohormona [mg/kg]	Mes de cosecha de <i>Acanthophora spicifera</i>	
	Septiembre (2022)	Enero (2023)
<b>KIN</b>	1.12±0.28	0.70±0.01
<b>AIA</b>	1.59±0.28	3.12±0.13
<b>GA3</b>	5.05±0.58	8.68±1.08

El cultivo de la macroalga *Acanthophora spicifera* cosechada en el mes de septiembre se dio a finales del mes de agosto en la comuna San Pedro, perteneciente a la provincia de Santa Elena en Ecuador. Mientras que la muestra cosechada en el mes de enero fue cultivada en el mes de diciembre en la misma ubicación. En la Tabla 19, se muestran datos meteorológicos de interés de la provincia en esos meses.

**Tabla 19.**

*Condiciones meteorológicas en el mes de agosto, septiembre y diciembre de 2022 y enero de 2023 en Santa Elena*

Mes de cultivo	Datos meteorológicos en Santa Elena	
	Temperatura promedio	Temperatura promedio del agua
Agosto (2022)	17.5°C - 21°C	22°C
Septiembre (2022)	18°C - 21°C	22°C
Diciembre (2022)	22°C - 25°C	24°C
Enero (2023)	22.5°C - 25.5°C	24°C - 25°C

Nota. Datos tomados de Weather Spark

(<https://es.weatherspark.com/m/18289/1/Tiempo-promedio-en-enero-en-Santa-Elena-Ecuador>)

Como se puede visualizar en la tabla de cuantificación de fitohormonas, la macroalga *Acanthophora spicifera* tiene mayor concentración de fitohormonas en la cosecha del mes de enero (2023). Entre los factores que pudieron afectar el desarrollo de las hormonas vegetales se puede mencionar condiciones del agua (pH, salinidad, temperatura, etc.), tiempo del ciclo de cultivo y condiciones climáticas. El crecimiento y desarrollo del alga marina se puede ver afectado por factores abióticos como temperatura, pH, salinidad, nutrientes, entre otros factores en el ecosistema marino (Pereira et al., 2017). Respecto al estudio de Pereira (2017), la macroalga *Acanthophora spicifera* tolera rangos de salinidad entre 25 UPS – 40 UPS mientras que para rangos superiores el crecimiento del alga se vio ralentizado (Pereira et al., 2017).

### 3.3 Comparación con otros estudios

La información acerca la cuantificación de fitohormonas en *Acanthophora spicifera* es escasa en comparación con otras macroalgas tanto de manera nacional como internacional. La excepción es el estudio de que recolecta Guillen (2022) con esta alga roja cuya información conocida por el momento es su lugar de cosecha en Vietnam. En la Tabla 20, se observa que el autor reportó cantidades exuberantes de estas hormonas reguladoras de crecimiento en comparación con este estudio. Sin embargo, las condiciones de cultivo y cosecha (fecha y locación), pretratamiento y tratamiento de la

muestra, método de identificación y cuantificación de fitohormonas no son reportadas lo que hizo que la comparación con este estudio fuera no justificada del todo.

**Tabla 20.**

*Comparación de fitohormonas en Acanthophora spicifera cuantificadas con estudios de otros países.*

Fitohormona	<i>Acanthophora spicifera</i>		
	Experimentación		Reportado
	Septiembre (2022)	Enero (2023)	(Guillen et al.,2022)
<b>KIN [mg/kg]</b>	1.12 ± 0.28	0.70 ± 0.01	15.3 *
<b>AIA [mg/kg]</b>	1.59 ± 0.28	3.12 ± 0.13	-
<b>GA3 [mg/kg]</b>	5.05 ± 0.58	8.68 ± 1.08	157 *

\* Guillen reporta el grupo de Citoquininas

\* Guillen reporta el grupo de Giberelinas

### 3.4 Análisis de costos

Para el diseño de la planta se hizo un barrido de los equipos básicos en los diferentes procesos de la operación. Se buscó que el diseño de la Figura 8 se construyera por duplicado para la producción de dos bioestimulantes con extracto de algas diferentes: *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* y que su contenido de fitohormona sea referenciado con los resultados de la cuantificación. La información técnica de los equipos y su precio estimado en dólares americanos son resumidos en la Tabla 21.

**Tabla 21.***Información técnica de los equipos de la propuesta de planta*

<b>Equipo</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Material</b>	<b>Capacidad</b>	<b>Potencia</b>	<b>Voltaje</b>	<b>Precio estimado</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Lavadero</b>	Tank-101	Acero inoxidable	1200 x 650 x 900 mm; 75 L	N/A	N/A	\$ 453.89	Poza(s) en acero inoxidable; Poza(s) de 500 x 500 x 300 mm. (largo, ancho, fondo)
<b>Mezclador</b>	Mixer-101	Acero inoxidable	2300x680x1060; 240 kg; 5000 L máx.	3.5 kW	110V/220V/380V	\$ 2,500.00	41 rpm
<b>Filtros de manga</b>	Filter-101	Propileno	7 L	N/A	N/A	\$ 25.00	1 MIC 7 1/6" – 32"
<b>Tanque reservorio</b>	Tank-102	Acero inoxidable	1500x1150mm ; 2000 L	N/A	N/A	\$ 1,500.00	Presión de trabajo: -0.1-1.6 MPa; Temperatura de trabajo: -4-150°C

El costo de la planta se detalla en la Tabla 22. Se tomó en cuenta los que equipos para la extracción se comprarán por duplicado por lo anteriormente descrito. El costo de los equipos se resume en un subtotal del cuál se agrega un 60% del mismo para costos adicionales como tuberías, equipos y materiales eléctricos, instrumentación y controles, y equipo de protección personal. Además, para la proyección de rentabilidad a 5 años se calculó la depreciación de los equipos básicos.

**Tabla 22.**

*Costo total de los equipos básicos de la propuesta de planta*

<b>Equipo</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>Costo unitario</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo total</b>
Lavadero	Tank-101	\$ 460.00	1	\$ 460.00
Mezclador	Mixer-101	\$ 2,500.00	2	\$ 5,000.00
Filtros de manga	Filter-101	\$ 25.00	20	\$ 500.00
Tanque reservorio	Tank-102	\$ 1,500.00	6	\$ 9,000.00
Refrigerador/Congelador	-	\$ 596.00	2	\$ 1,192.00
			Subtotal	\$ 16,152.00
			Misceláneo y PPE	\$ 9,691.20
			Depreciación	\$ 3,230.40
			<b>Total</b>	<b>\$ 29,073.60</b>

En las siguientes tablas, se detallan los costos de los reactivos utilizados, materia prima y servicios utilitarios de la planta. La tabla 23 describe un estimado del consumo energético diario de la planta tomando en cuenta las cargas batch en el día. El precio del servicio de energía eléctrica es de 9.2 centavos de dólar por cada kWh según el Directorio de la Agencia de Regulación y Control de Energía y Recursos Naturales No Renovables (ARCERNNR).

**Tabla 23.**

*Consumo eléctrico de los equipos de la propuesta de planta*

<b>Equipo</b>	<b>Etiqueta</b>	<b>kW</b>	<b>Tiempo: horas</b>	<b>kWh</b>
Mezclador	Mixer-101	3.5	4	14
Refrigerador/ Congelador	-	0.25	24	6
			<b>Total</b>	<b>20</b>

Desde el 2020, el costo por m<sup>3</sup> de agua potable es de \$3.50 que aumenta hasta \$5.00 con el servicio de alcantarillado para las industrias en Guayaquil. En Cuenca, la tarifa de agua por m<sup>3</sup> oscila entre \$0.83-\$1.24 según el consumo. Comparado con otras ciudades, este servicio resulta elevado para la ciudad y sector de interés. Más aún con las cotizaciones de m<sup>3</sup> de agua destilada cuyos precios varían hasta más de \$500.00.

Respecto a la materia prima, resulta barata ya que es de origen nacional y sus costos disminuyen en contraste con algas exportadas que llegan de \$2.50 hasta \$3.00 por kg.

Para este diseño, se tomó en cuenta el valor de compra de alga de Murillo&Romo (2021) con un aumento por motivos de cosecha y flete. En la Tabla 24, se detalla el costo unitario de los reactivos y materia prima.

**Tabla 24.**

*Costo unitario de reactivos y materia prima de la propuesta de planta*

<b>Reactivos</b>	<b>Unidad</b>	<b>Costo Unitario</b>
Agua potable	m <sup>3</sup>	\$ 5.00
Agua destilada	m <sup>3</sup>	\$ 407.00
<i>Ulva</i> sp.	kg	\$ 0.75
<i>Acanthophora spicifera</i>	kg	\$ 0.75

Para el cálculo de la cantidad de trabajadores necesarios para la planta se utilizó una ecuación del libro de Turton en la que en base al tipo y cantidad de equipos de la planta realiza una estimación de operadores. Para este diseño se estimó 12 operadores que con el sueldo básico unificado del 2022 más costos adicionales ganan \$3.74 por hora. Por otro lado, se consideraron gastos adicionales como el envasado, la alimentación, servicio eléctrico ajeno a los equipos de la planta, etc. Además, se supuso el uso de 10 kg de *Ulva* sp. y 10 kg de *Acanthophora spicifera* diarios para la operación.

Recopilando toda la información anterior y calculando los costos de producción por día se obtuvo un gasto total diario de \$385.72. En la Tabla 25, se describe con más detalle precisión el costo de la producción diaria.

**Tabla 25.**

*Gasto de producción diaria de la propuesta de planta*

<b>Gasto diario</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo</b>
<i>Ulva</i> sp.	kg	10	\$ 7.50
<i>Acanthophora spicifera</i>	kg	10	\$ 7.50
Agua potable	m <sup>3</sup>	16	\$ 80.00
Agua destilada	m <sup>3</sup>	0.16	\$ 65.26
Consumo energético	kW	20	\$ 1.84
Empleados	-	13	\$ 48.62
Envasado	-	1	\$ 75.00
Otros	-	1	\$ 100.00
		<b>Total</b>	<b>\$ 385.72</b>

Para el cálculo de los ingresos, se consideró suposiciones de Murillo&Romo (2021) en base a rendimientos presentados por Eswaran (2005) para la extracción de bioestimulante, en donde del filtrado se obtuvo un 65% en peso de bioestimulante concentrado, es decir, 6.5 kg de bioestimulante líquido concentrado. Al buscar obtener un bioestimulante líquido diluido 7.5%, se agregó 80.17 kg de agua destilada para así obtener 86.67 kg del producto esperado. Con los datos del laboratorio, se estimó la densidad de los extractos por lo que se interpretó al final una producción, tomando en cuenta de las dos macroalgas, de 214.65 litros de bioestimulante diluido 7.5%. En base a lo reportado en la investigación del presente trabajo, se detalla la composición de fitohormonas en el EBLD de las macroalgas en la Tabla 26.

**Tabla 26.**

*Composición de fitohormonas del EBLD en ppm*

	<i>Ulva sp.</i>	<i>Acanthophora spicifera</i>
KIN	0.13	0.04
GA3	0.85	0.18
AIA	1.34	0.50

El ingreso estimado se realizó por los kg producidos de bioestimulante y el gasto de producción diario con un valor de venta de \$2.23, que considerando un porcentaje extra de 25% sobre dicho valor como utilidad queda en \$2.78. Para la viabilidad del precio, se realizó un análisis de sensibilidad en el precio de venta. Como ingreso adicional, se vende a un precio cercano al de su cosecha el residuo del lodo orgánico de la *Acanthophora spicifera* por su alto interés como aditivo alimenticio con un precio de venta de \$0.15 por kg. En la tabla 27, se detalla los ingresos diarios de la planta.

**Tabla 27.***Desglose de los ingresos diarios de la propuesta de planta*

<b>Ingresos diarios</b>	<b>Precio</b>	<b>Venta</b>
kg EBD <i>Ulva</i> sp.	\$ 2.78	\$ 240.93
<b>kg EBD <i>Acanthophora spicifera</i></b>	\$ 2.78	\$ 240.93
<b>kg Sólido sobrante <i>Acanthophora spicifera</i></b>	\$ 0.15	\$ 0.53
	<b>Total</b>	\$ 482.39

Para la inversión inicial, se consideró costos de instalación y otros (supervisión, construcción y contingencia) además del costo de la planta. Estos representan un 33% y un 25% del costo total de la planta respectivamente. Entonces, la inversión inicial sería de \$45,936.29, los detalles están descritos en la Tabla 28.

**Tabla 28.***Desglose de la inversión inicial para puesta en marcha*

<b>Inversión inicial</b>	<b>Costo</b>
Equipos	\$ 29,073.60
Instalación	\$ 9,594.29
Otros	\$ 7,268.40
<b>Total</b>	\$ 45,936.29

Tanto los gastos como los ingresos calculados se basaron en un día laboral, por lo que si consideramos que un mes laboral tiene 20 días (lunes a viernes) el egreso aumenta a \$7,714.35 y el ingreso a \$9,647.83 dando una ganancia de \$1,933.48 mensualmente.

**Tabla 29.***Balance de ganancia neta mensual*

Proyección	Gastos	Ingresos	Ganancia
Mensual (20 días laborables)	\$ 7,714.35	\$ 9,647.83	\$ 1,933.48

El flujo de caja se detalla en la Tabla 30, en donde con una inversión de \$45,936.29 y una utilidad mensual de \$1,933.48 la planta se vuelve rentable al vigésimo cuarto mes. En la Figura 17, se observa la proyección de rentabilidad a 5 años. Aquí se observa que entre el año 3 y 4 se puede hacer otra inversión para mejoras dentro de la planta.

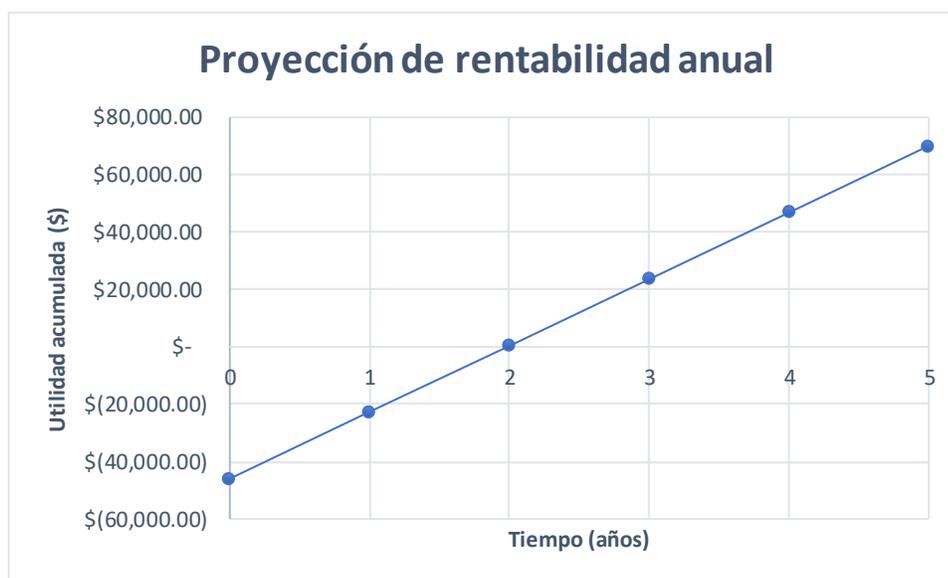
**Tabla 30.***Flujo de caja de la propuesta de planta*

Mensual	Ingresos	Acumulado
0	-\$ 45,936.29	-\$ 45,936.29
1	\$ 1,933.48	-\$ 44,002.81
2	\$ 1,933.48	-\$ 42,069.33
3	\$ 1,933.48	-\$ 40,135.85
4	\$ 1,933.48	-\$ 38,202.37
5	\$ 1,933.48	-\$ 36,268.89
6	\$ 1,933.48	-\$ 34,335.41
7	\$ 1,933.48	-\$ 32,401.93
8	\$ 1,933.48	-\$ 30,468.45
9	\$ 1,933.48	-\$ 28,534.97
10	\$ 1,933.48	-\$ 26,601.49
11	\$ 1,933.48	-\$ 24,668.01
12	\$ 1,933.48	-\$ 22,734.54
13	\$ 1,933.48	-\$ 20,801.06
14	\$ 1,933.48	-\$ 18,867.58
15	\$ 1,933.48	-\$ 16,934.10
16	\$ 1,933.48	-\$ 15,000.62
17	\$ 1,933.48	-\$ 13,067.14

<b>18</b>	\$ 1,933.48	-\$ 11,133.66
<b>19</b>	\$ 1,933.48	-\$ 9,200.18
<b>20</b>	\$ 1,933.48	-\$ 7,266.70
<b>21</b>	\$ 1,933.48	-\$ 5,333.22
<b>22</b>	\$ 1,933.48	-\$ 3,399.74
<b>23</b>	\$ 1,933.48	-\$ 1,466.26
<b>24</b>	\$ 1,933.48	\$ 467.22

**Figura 17.**

*Proyección de rentabilidad a 5 años*



Para observar el impacto del costo de venta del EBLD, se realizó un análisis de sensibilidad con el objetivo de justificar el valor actual de venta. El rango escogido para este análisis está entre \$2.50-3.02 y se detalla en la Tabla 31.

**Tabla 31.**

*Análisis de sensibilidad del precio de venta de EBLD de la propuesta de planta*

<b>Precio de venta</b>	<b>Ingreso diario</b>	<b>Ingreso mensual</b>	<b>Utilidad mensual</b>	<b>Meses de retorno</b>
\$2.50	\$433.86	\$8,677.17	\$962.81	48
\$2.54	\$440.79	\$8,815.83	\$1,101.48	42
\$2.58	\$447.73	\$8,954.50	\$1,240.15	37
\$2.62	\$454.66	\$9,093.17	\$1,378.81	34
\$2.66	\$461.59	\$9,231.83	\$1,517.48	31
\$2.70	\$468.53	\$9,370.50	\$1,656.15	28
\$2.74	\$475.46	\$9,509.17	\$1,794.81	26
\$2.78	\$482.39	\$9,647.83	\$1,933.48	24
\$2.82	\$489.33	\$9,786.50	\$2,072.15	22
\$2.86	\$496.26	\$9,925.17	\$2,210.81	21
\$2.90	\$503.19	\$10,063.83	\$2,349.48	20
\$2.94	\$510.13	\$10,202.50	\$2,488.15	18
\$2.98	\$517.06	\$10,341.17	\$2,626.81	17
\$3.02	\$523.99	\$10,479.83	\$2,765.48	16
\$3.06	\$530.93	\$10,618.50	\$2,904.15	15

Con esta tabla, se evidencia que se requiere un mayor porcentaje de utilidad sobre el precio calculado para recuperar lo invertido en menor tiempo.

# CAPÍTULO 4

## 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 4.1 Conclusiones

El presente trabajo de investigación logró obtener resultados nos permiten concluir que:

- Las curvas de calibración a partir del mix de fitohormonas se establecieron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la determinación de cualquier tipo de muestra algal que requiera identificar y cuantificar GA3, AIA y KIN. Para el caso del AIA, esta curva solo es válida para concentraciones mayores a 0.21 ppm.
- La cuantificación de fitohormonas en *Ulva* sp. y *Acanthophora spicifera* por métodos cromatográficos fue logrado con resultados diferentes en las muestras de dos meses diferentes: septiembre 2022 y enero 2023.
- En *Ulva* sp. se dio una cuantificación completa para la muestra del mes de septiembre 2022 en comparación con la muestra de enero 2023. Esto indica que la temporada seca en la que fue cultivada y cosechada (agosto, septiembre 2022) repercute en una mayor producción y aparición de fitohormonas que en la temporada lluviosa (enero 2023).
- En *Acanthophora spicifera* se dio una cuantificación completa para ambas muestras, aunque en menor proporción para el mes de septiembre 2022. Se

infiere que la salinidad en dicho mes pudo ser mayor ya que influye en el crecimiento del alga, y, por ende, en la producción de fitohormonas durante dicha etapa de su ciclo de vida.

- La planta propuesta para la producción de un bioproducto como un bioestimulante dio una producción diaria de 214.64 litros de EBLD a partir de 20 kg de materia prima algal.
- La composición de KIN, AIA y GA3 en el EBLD en base de *Ulva* sp. de septiembre 2022 es de 0.13, 0.85 y 1.34 ppm por litro de bioproducto.
- La composición de KIN, AIA y GA3 en el EBLD en base de *Acanthophora spicifera* de enero 2023 es de 0.04, 0.18 y 0.50 ppm por litro de bioproducto.

## 4.2 Recomendaciones

Se recomienda realizar la cuantificación de fitohormonas por HPLC con extractos que utilicen solventes diferentes al utilizado en esta tesis académica, o en su defecto, con mezclas binarias (agua, metanol, etanol, ácido fórmico, etc.) para la comparación con diversos estudios internacionales existentes actualmente; y, a su vez ser base de los posibles estudios a futuro de estas macroalgas en el país.

Se aconseja iniciar un diseño experimental con la producción de un extracto bioestimulante a partir de las algas estudiadas en diferentes solventes mediante el proceso extractivo propuesto en el diseño de la planta, con la finalidad de determinar la mejor

combinación de variables que tengan efectos positivos en diversos cultivos significantes del Ecuador al aplicarse de manera foliar.

Se sugiere la aplicación de un solvente polar, de preferencia metanol o etanol, en la etapa de homogenización del proceso, con la misma cantidad de materia algal, en diferentes proporciones con el fin de comprobar un aumento de fitohormonas presentes en el extracto concentrado de las algas estudiadas para la elección de la mejor mezcla extractiva.

Se invita a implementar a escala piloto otros métodos extractivos como fluido supercrítico CO<sub>2</sub> o asistida por ultrasonido para la obtención de un ELB, con el propósito de contrastar sus rendimientos con el método sugerido en el presente trabajo mediante la evaluación de sus efectos en cultivos con aplicación foliar.

## REFERENCIAS

- Abril, N. (2010). Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. SAE Technical Papers.
- Barciszewski, J., Rattan, S. I., Siboska, G., & Clark, B. (1999). Kinetin — 45 years on. *Plant Science*, 37-45.
- Bhalla, K., Singh, S. B., & Agarwal, R. (2010). Quantitative determination of gibberellins by high performance liquid chromatography from various gibberellins producing Fusarium strains. *Environmental Monitoring and Assessment*, 167(1-4).  
<https://doi.org/10.1007/s10661-009-1068-5>
- Borjas-Ventura, R., Julca-Otiniano, A., & Alvarado-Huamán, L. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2). <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2020.080200150>
- Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. In *Plant and Soil* (Vol. 383, Issues 1-2). <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>
- Caric, D., Tomisic, V., Kveder, M., Galic, N., Pifat, G., Magnus, V., & Soskic, M. (2004). Absorption and fluorescence spectra of ring-substituted indole-3-acetic acids. *Biophysical Chemistry* 111, 247-257.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. In *Journal of Applied Phycology* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9560-4>
- CIBE (2022). DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

- D'armas, H., Jaramillo, C., D'armas, M., Echavarría, A., & Valverde, P. (2019). Proximate composition of several macroalgae from the coast of Salinas Bay, Ecuador. *Revista de Biología Tropical*, 67(1).  
<https://doi.org/10.15517/RBT.V67I1.33380>
- Dominguez, H., & Loret, E. P. (2019). *Ulva lactuca*, A Source of Troubles and Potential Riches. In *Marine Drugs* (Vol. 17, Issue 6). MDPI AG.  
<https://doi.org/10.3390/md17060357>
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196).  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- el Boukhari, M. E. M., Barakate, M., Bouhia, Y., & Lyamlouli, K. (2020). Trends in seaweed extract based biostimulants: Manufacturing process and beneficial effect on soil-plant systems. In *Plants* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/plants9030359>
- Espinosa-Antón, A., Hernández-Herrera, R., & González-González, M. (2020). Extractos bioactivos de algas marinas como bioestimulantes del crecimiento y la protección de las plantas. In *Artículo de revisión Biotecnología Vegetal* (Vol. 20, Issue 4).
- García F. Programa de la asignatura Biología y Botánica, Fitorreguladores, Parte III, Tema 14, Universidad Politécnica de Valencia. España, 2003
- García, I. B., Ledezma, A. K. D., Montañó, E. M., Leyva, J. A. S., Carrera, E., & Ruiz, I. O. (2020). Identification and quantification of plant growth regulators and antioxidant compounds in aqueous extracts of *Padina durvillaei* and *ulva lactuca*. *Agronomy*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy10060866>

González J. (2022). El uso de algas marinas como bioestimulantes.

<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/29095/El%20uso%20de%20algas%20marinas%20como%20bioestimulantes.pdf?sequence=1#:~:text=Los%20extractos%20de%20algas%20marinas,de%20estr%C3%A9s%20abi%C3%B3tico%20y%20bi%C3%B3tico.>

Guillén, P. O., Motti, P., Mangelinckx, S., De Clerck, O., Bossier, P., & Van Den Hende, S. (2022). Valorization of the chemical diversity of the tropical red seaweeds *Acanthophora* and *Kappaphycus* and their applications in aquaculture: A review. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.957290>

Górka, B., & Wiczorek, P. P. (2017). Simultaneous determination of nine phytohormones in seaweed and algae extracts by HPLC-PDA. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1057. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.04.048>

Gupta, V., Kumar, M., Brahmabhatt, H., Reddy, C. R. K., Seth, A., & Jha, B. (2011). Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(11). <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.004>

Henderson, J. W., Jr, Martone, N., & De, U. (2006). Improve peak shape and productivity in HPLC analysis of pharmaceutical compounds with eclipse plus C8 columns. *Agilent.com*. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-5803EN.pdf>

- Hurtado Fernández, E. (2018). Medición de hormonas vegetales mediante HPLC-masas triple cuadrupolo (HPLC-MS QqQ) en extractos de plantas sometidas a estrés por daño mecánico. Jaén: Universidad de Jaén.
- Izabela Michalak, Bogusława Górka, Piotr P. Wiczorek, Edward Rój, Jacek Lipok, Bogusława Łęska, Beata Messyasz, Radosław Wilk, Grzegorz Schroeder, Agnieszka Dobrzyńska-Inger & Katarzyna Chojnacka (2016) Supercritical fluid extraction of algae enhances levels of biologically active compounds promoting plant growth, *European Journal of Phycology*, 51:3, 243-252, DOI: 10.1080/09670262.2015.1134813
- Michalak, I. and Chojnacka, K. (2014), Algal extracts: Technology and advances. *Eng. Life Sci.*, 14: 581-591. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400139>
- Murillo R., Romo R. (2021). Diseño de una planta piloto basado en la extracción de bioestimulantes de la macroalga *Kappaphycus alvarezii* con aplicación al sector agrícola. <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/52070>
- Oliveira, R. (2022). O uso de extratos comerciais de macroalgas como bioestimulantes. Leiría: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar.
- Pangestuti, R., Haq, M., Rahmadi, P., & Chun, B. S. (2021). Nutritional value and biofunctionalities of two edible green seaweeds (*Ulva lactuca* and *caulerpa racemosa*) from indonesia by subcritical water hydrolysis. *Marine Drugs*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/md19100578>
- Pereira, D. T., Simioni, C., Filipin, E. P., Bouvie, F., Ramlov, F., Maraschin, M., Bouzon, Z. L., & Schmidt, É. C. (2017). Effects of salinity on the physiology of the red

- macroalga, *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta, Ceramiales). *Acta Botanica Brasílica*, 31(4), 555–565. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0059>
- Quijano-Aviles, M., Gavica, W., Barragan, A., & Manzano, P. (2018). Determination of gibberellic acid in a commercial seaweed extract by capillary electrophoresis. *Scientia Agropecuaria*, 157-160.
- Revilla-Lovano, S., Sandoval-Gil, J. M., Zertuche-González, J. A., Belando-Torres, M. D., Bernardeau-Esteller, J., Rangel-Mendoza, L. K., Ferreira-Arrieta, A., Guzmán-Calderón, J. M., Camacho-Ibar, V. F., Muñiz-Salazar, R., & Ávila-López, M. del C. (2021). Physiological responses and productivity of the seaweed *Ulva ohnoi* (Chlorophyta) under changing cultivation conditions in pilot large land-based ponds. *Algal Research*, 56, 102316. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2021.102316>
- Roesijadi, G., Jones, S. B., & Zhu, Y. (2010). Macroalgae as a Biomass Feedstock : A Preliminary Analysis. *Analysis, September*.
- Saini, S., Kaur, N., & Pati, P. K. (2021). Phytohormones: Key players in the modulation of heavy metal stress tolerance in plants. In *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Vol. 223). <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112578>
- Sánchez, C., & Torres, G. (2021). Variación espacio-temporal en la composición de macroalgas en la zona intermareal rocosa en Salango, provincia de Manabí, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 15(1). <https://doi.org/10.53591/cna.v15i1.1321>
- SEZGİN, M., & KAHYA, M. (2018). Phytohormones. *Bitlis Eren University Journal of Science and Technology*, 8(1), 35–39. <https://doi.org/10.17678/beuscitech.386726>

- Sottofattori, E., Anzaldi, M., & Ottonello, L. (2001). HPLC determination of adenosine in human synovial fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1143-1146.
- Sytar, O., Kumari, P., Yadav, S., Brestic, M., & Rastogi, A. (2019). Phytohormone Priming: Regulator for Heavy Metal Stress in Plants. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 38, Issue 2, pp. 739–752). Springer New York LLC.  
<https://doi.org/10.1007/s00344-018-9886-8>
- Szkop, M., & Bielawski, W. (2013). A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(3). <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9838-4>
- Tan, C. Y., Dodd, I. C., Chen, J. E., Phang, S. M., Chin, C. F., Yow, Y. Y., & Ratnayeke, S. (2021). Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology, and application in agriculture: an overview. *Journal of Applied Phycology*.  
<https://doi.org/10.1007/s10811-021-02475-3>
- Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7).  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

# APÉNDICE



Figura A3.

Cromatograma de la muestra 3 de septiembre 2022

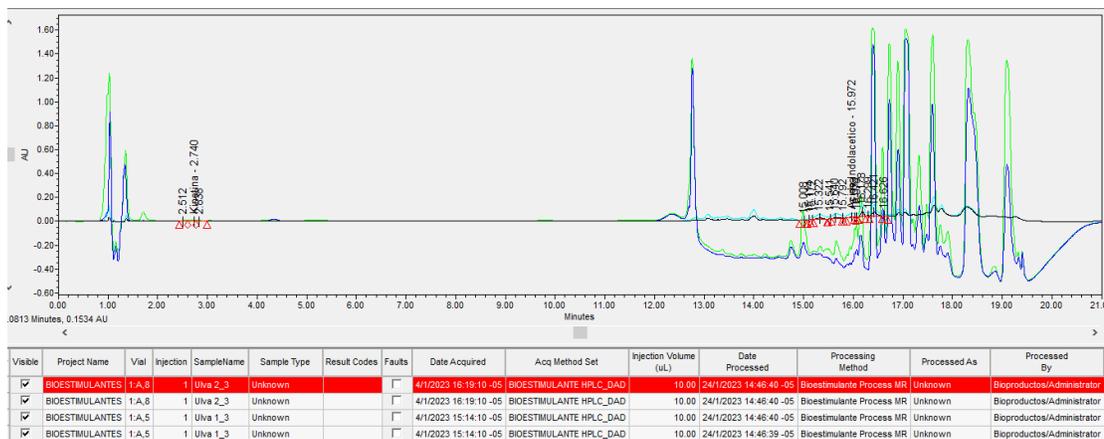


Figura A4.

Cromatograma de la muestra 1 de enero 2023

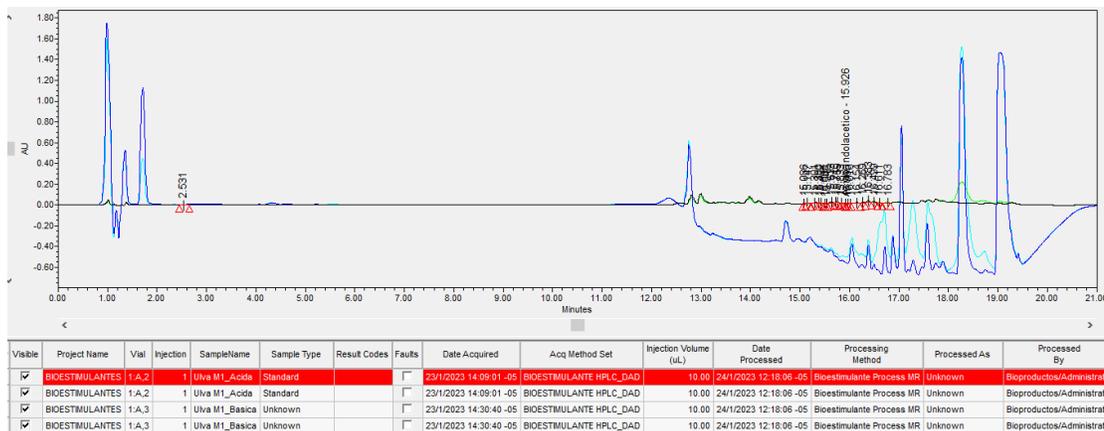


Figura A5.

Cromatograma de la muestra 2 de enero 2023

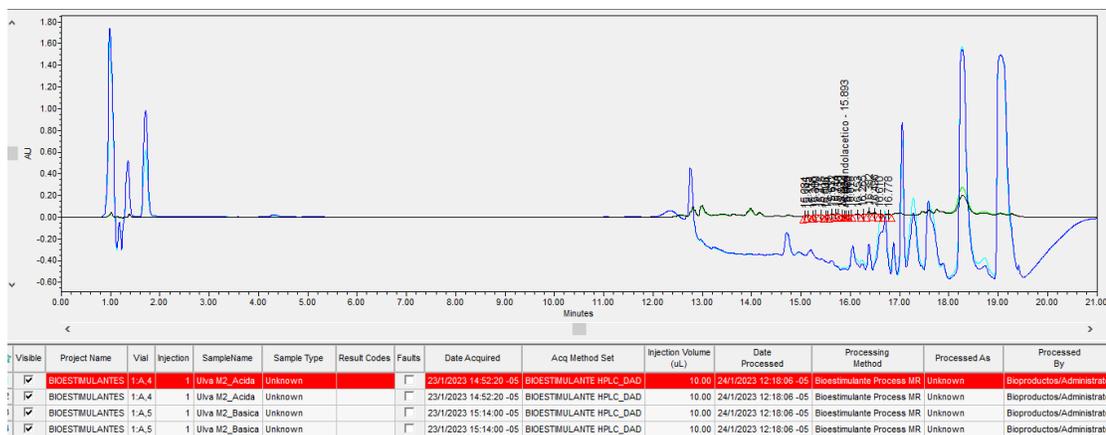
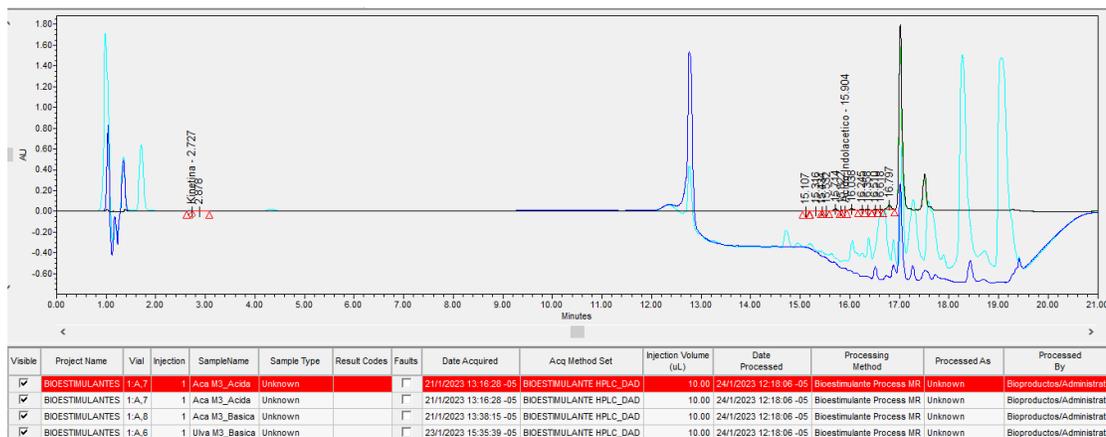


Figura A6.

Cromatograma de la muestra 1 de enero 2023



## Apéndice B

### Cromatogramas de las muestras de *Acanthophora spicifera*

Figura B1.

Cromatograma de la muestra 1 de septiembre 2022

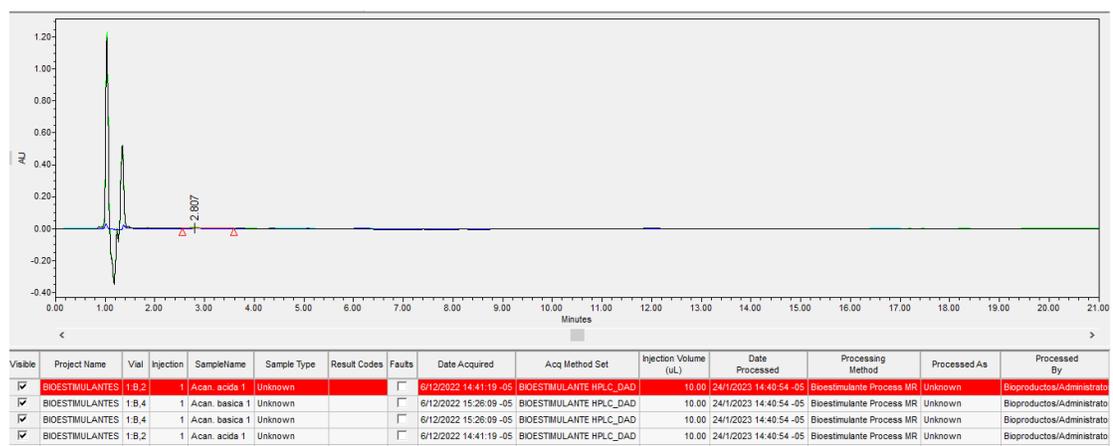
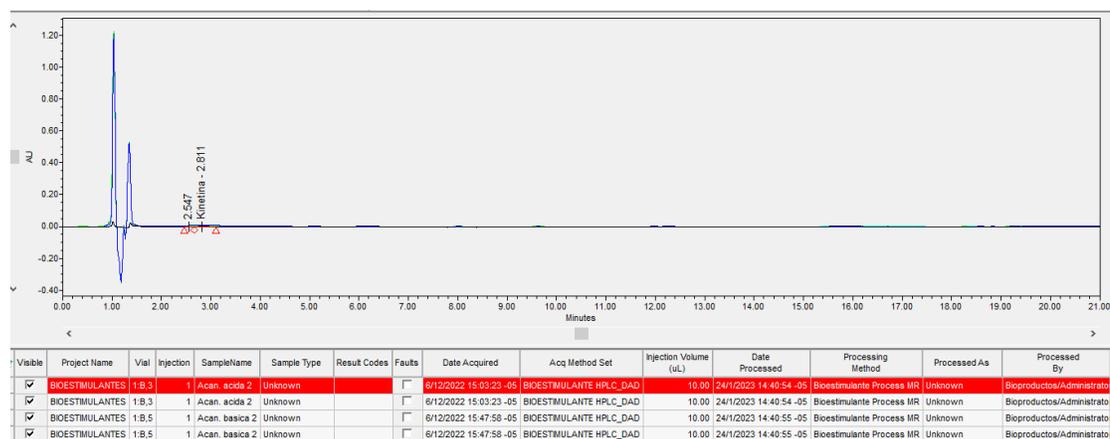


Figura B2.

Cromatograma de la muestra 2 de septiembre 2022







## Apéndice C

### Equipos de la planta de extracto a partir de algas propuesta

Figura C1.

Lavadero para macroalgas



Figura C2.

Mezclador



Figura C3.

Filtros de manga y filtro Duplex



Figura C4.

Tanques de almacenamiento

