

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

“Cuantificación de flavonoides mediante técnicas cromatográficas en biomasa de macroalga *Acanthophora spicifera* recolectada en diferentes meses del año”

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Camila Lorena Cruz Cordovez

Luis Arturo Romero Ochoa

Tutor(a):

Michael Rendón Morán, M.Sc.

Cotutor(a):

Patricia Manzano Santana, PhD.

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2023

DEDICATORIA

El presente proyecto se lo dedico a mis padres, Carlos Enrique Cruz Game y Maria Lorena Cordovez Ferretto, por haberme apoyado a lo largo de toda mi vida y motivarme a siempre seguir adelante. A mis hermanos, Carlos Alberto Cruz Cordovez y Nicolas Andres Cruz Cordovez, por ser mi apoyo incondicional y ayudarme siempre que lo necesito.

Camila Lorena Cruz Cordovez.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a:

Mi familia, a quienes estaré eternamente agradecida por todo lo que me han dado y enseñado a lo largo de toda mi vida. Pero sobre todo por soportarme hasta en los momentos más difíciles.

Mis amigos, tanto de la universidad como de la vida, por estar conmigo siempre que los he necesitado.

Mis profesores y profesoras, que me han guiado a lo largo de la carrera.

A mi tutor Michael Rendon, cotutora Patricia Manzano e Ivan Choez por darme de su tiempo y conocimientos para poder culminar con la tesis.

A mi compañero de tesis, Luis Arturo Romero, por ayudarme en todo el proceso de la tesis y soportarme en los últimos meses.

Camila Lorena Cruz Cordovez

DEDICATORIA

Este proyecto lo dedico con mucho cariño a mis padres, Arturo Romero Loayza y Mercedes Ochoa Carrión, a mis hermanos Roberth Romero Ochoa y Lucía Romero Ochoa, y a mi pareja Analí Gallardo Maldonado, quienes me han brindado su amor y apoyo incondicional, ayudándome a conseguir mis metas y alentándome a seguir adelante ante cualquier adversidad. A ustedes mi más profundo amor y respeto.

Luis Arturo Romero Ochoa

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por brindarme su apoyo y enseñarme sus valores, logrando convertirme en el ser humano que soy hoy en día.

Mi compañera de tesis Camila Cruz Cordovez y a su familia, quienes me recibieron como un miembro más de su hogar y han brindado su ayuda en los momentos difíciles que se dieron en el proceso.

A mis maestros, Patricia Manzano Santana, Michael Rendón Morán e Ivan Choez Guaranda, quienes han dedicado parte de su tiempo en guiarnos y brindarnos sus conocimientos para poder cumplir a cabalidad con los objetivos de este proyecto.

A todos ustedes mi más sincero agradecimiento por formar parte de este proceso.

Luis Arturo Romero Ochoa

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Camila Lorena Cruz Cordovez* y *Luis Arturo Romero Ochoa* 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”



Camila Cruz Cordovez



Arturo Romero Ochoa

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**MICHAEL
GUILLERMO
RENDON
MORAN**

Nadia Flores Manrique, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

Michael Rendón Morán, M.Sc.

PROFESOR TUTOR



Firmado electrónicamente por:
**PATRICIA
ISABEL
MANZANO
SANTANA**

Patricia Manzano Santana, PhD.

PROFESOR(A) COTUTOR(A)

RESUMEN

El presente estudio se enfoca en la cuantificación, por Cromatografía Líquida de alta Resolución HPLC (por sus siglas en inglés), de compuestos flavonoides presentes en la macroalga roja *Acanthophora spicifera* colectada en las costas de Ecuador en dos meses diferentes, septiembre del 2022 y enero del 2023. Para este proyecto se realizaron tres técnicas de extracción sólido-líquido: digestión con agua destilada, digestión con etanol al 80% y extracción asistida por ultrasonido (sonicación) con etanol al 80%, con el fin de obtener extractos ricos en flavonoides. Para la cuantificación mediante HPLC, se analizaron los siguientes flavonoides: (+)-Catequina, Procianidina B2, Procianidina C1, (-)- Epicatequina, Rutina, Quercetina y Naringenina. Los mismos que fueron preparadas bajo los protocolos internos establecidos por el laboratorio de Bioproductos del CIBE-ESPOL. Mediante los análisis estadístico ANOVA y T-test realizados con un nivel de confianza del 95%, se determinó que existe una mayor concentración de flavonoides en el extracto acuoso de la macroalga recolectada en el mes de septiembre, donde se identificó la presencia de Rutina, (+)-Catequina y Procianidina B2, dando como resultado una cantidad total de 30.656 ± 0.727 mg/ kg b.s. Debido a la escasa investigación acerca de los compuestos polifenólicos en la macroalga *Acanthophora spicifera*, este estudio aporta con información importante acerca de su biodisponibilidad e incita a futuras investigaciones que demuestren el potencial contenido de compuestos bioactivos presentes en esta alga.

Palabras Clave: *Acanthophora spicifera*, Flavonoides, HPLC, Cuantificación, Época del año

ABSTRACT

*This study is focused on the quantification, by high performance liquid chromatography HPLC, of flavonoids compounds in the red macroalgae *Acanthophora spicifera* collected in Ecuadorian coast, in different months, September 2022 and January 2023. For this project, three solid-liquid extraction techniques were carried out: digestion with distilled water, digestion with 80% ethanol and ultrasound-assisted extraction with 80% ethanol, to obtain extracts rich in flavonoids. For HPLC quantification, the next flavonoids were analyzed: (+)-Catechin, Procyanidin B2, Procyanidin C1, (-)- Epicatechin, Rutin, Quercetin and Naringenin. Which were prepared under the internal protocols established by the Bioproducts laboratory CIBE-ESPOL. Through statistical analysis ANOVA and T-test, at the 95 % confidence level, it was that there is a higher flavonoid concentration in the aqueous extract from the macroalgae collected in September, where the presence of Rutin, (+)-Catechin and Procyanidin B2 were identified, with a total amount of 30.656 ± 0.727 mg/kg DW. Due to little research on polyphenolic compounds present in macroalgae *Acanthophora spicifera*, this research provides important information about its bioavailability and encourages future research to demonstrates the potential content of bioactive compounds present in algae.*

Keywords: *Acanthophora spicifera, Flavonoids, HPLC, Quantification.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	7
RESUMEN	8
<i>ABSTRACT</i>	9
Capítulo 1.....	17
1. Introducción	17
1.1 Descripción del Problema	17
1.2 Justificación del Problema	18
1.3 Objetivos	21
1.3.1 Objetivo General.....	21
1.3.2 Objetivos Específicos.....	21
1.4 Marco teórico	21
<i>1.4.1 Acanthophora spicifera</i>	21
1.4.2 Compuestos fenólicos	24
1.4.3 Flavonoides.....	24
1.4.4 Aplicaciones de flavonoides	34
Capítulo 2.....	36
2. Metodología	36
2.1 Esquema de trabajo	36
2.2 Diseño de experimentos	37
2.3 Cosecha y almacenamiento de la macroalga <i>Acanthophora spicifera</i>	38
2.4 Pretratamiento de la macroalga	38
2.4.1 Lavado.....	38

2.4.2	Liofilización.....	38
2.4.3	Molienda.....	39
2.5	Extracción de macroalga <i>Acanthophora spicifera</i>	40
2.5.1	Digestión con Etanol al 80%.....	40
2.5.2	Sonicación con Etanol al 80%.....	41
2.5.3	Digestión con Agua.....	42
2.6	Cuantificación de compuestos flavonoides utilizando HPLC.....	42
2.6.1	Preparación de los estándares y curva de calibración.....	43
2.6.2	Análisis estadístico de la curva de calibración.....	45
2.6.3	Preparación de los extractos.....	45
2.6.4	Cuantificación de flavonoides en los extractos.....	47
2.7	Elaboración de protocolos de laboratorio.....	47
Capítulo 3.....		49
3.	Resultados y Análisis.....	49
3.1	Análisis de estándares y curva de calibración.....	49
3.2	Extractos de macroalga.....	50
3.3	Análisis de resultados de la cuantificación.....	51
3.3.1	Macroalga recolectada en septiembre del 2022.....	52
3.3.2	Macroalga recolectada en el mes de enero del 2023.....	54
3.3.3	Comparación entre los meses de recolección de la macroalga.....	56
3.4	Tratamiento estadístico de los datos.....	57
3.5	Protocolo de laboratorio.....	59
3.6	Análisis económico.....	59
Capítulo 4.....		66
4.	Conclusiones y Recomendaciones.....	66

4.1	Conclusiones	66
4.2	Recomendaciones.....	68
BIBLIOGRAFÍA		70

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
MAATE	Ministerio de Agua Ambiente y Transición Ecológica
MAE	Ministerio de Ambiente del Ecuador
CMNUCC	Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático
REDD+	Reducción de emisiones por deforestación y degradación forestal
REM	REDD Early Movers
DIPSIMAR	Desarrollo e Implementación Piloto de Sistemas de Maricultura que generen incentivos en la conservación del manglar
CIBE	Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigación
PDA	Arreglo de fotodiodos
ANOVA	Análisis de Varianza

SIMBOLOGÍA

m	Metros		mg/kg p.s	Miligramo por kilogramos en
cm	Centímetros		peso seco	
mm	Milímetros		mol	Mol
µm	Micrómetros		mmol	Mili mol
nm	Nanómetros		ppm	Partes por millón
Kg	Kilogramos		h	Horas
g	gramos		min	Minutos
mg	Miligramos		s	Segundos
m ³	Metros cúbicos		°C	Grados Celsius
L	Litros		kWh	KiloWats hora
mL	Mililitros		mbar	Mili Bar
µL	Microlitros			

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Macroalga Acanthophora spicifera</i>	22
Figura 2 <i>Estructura de la molécula de los flavonoides</i>	25
Figura 3 <i>Esquema de trabajo</i>	36
Figura 4 <i>Proceso de secado en equipo liofilizador de la macroalga</i>	39
Figura 5 <i>Triturador de granos</i>	40
Figura 6 <i>Sistema de filtración al vacío</i>	41
Figura 7 <i>Viales cromatográficos HPLC con su respectivo extracto</i>	46
Figura 8 <i>Esquema de flujo del proceso de extracción de la macroalga a nivel industrial</i>	60
Figura 9 <i>Flujo de caja del proceso de extracción de la macroalga Acanthophora spicifera</i>	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Compuestos fenólicos presentes en la macroalga Acanthophora spicifera</i>	23
Tabla 2 <i>Estructura molecular de flavonas más representativas</i>	26
Tabla 3 <i>Estructura molecular de los flavonoles más representativos</i>	27
Tabla 4 <i>Estructura molecular de las flavanonas más representativas</i>	29
Tabla 5 <i>Estructura molecular de las isoflavonas más representativas</i>	30
Tabla 6 <i>Estructura molecular de las antocianinas más representativas</i>	31
Tabla 7 <i>Estructura molecular de los flavanoles más representativas</i>	33
Tabla 8 <i>Variables del método de ANOVA de un factor, aplicada a cada uno de los meses de recolección de la macroalga Acanthophora spicifera</i>	37
Tabla 9 <i>Gradiente de elución de la fase móvil</i>	43
Tabla 10 <i>Tiempo de retención de los estándares empleados y longitud de onda</i>	44
Tabla 11 <i>Rendimiento en peso seco del extracto de la macroalga</i>	51
Tabla 12 <i>Cuantificación de flavonoides en extracto de macroalga Acanthophora spicifera del mes de septiembre del 2022</i>	54
Tabla 13 <i>Cuantificación de flavonoides en extracto de macroalga Acanthophora spicifera en enero del 2023</i>	55
Tabla 14 <i>Flavonoides detectados en cada extracción en dos meses del año</i>	56
Tabla 15 <i>Flavonoides totales detectados en la macroalga Acanthophora spicifera en dos meses diferentes</i>	57
Tabla 16 <i>Precio de los equipos para el proceso industrial de extracción</i>	60
Tabla 17 <i>Costos variables en el primer año</i>	62
Tabla 18 <i>Costos fijos en el primer año</i>	63
Tabla 19 <i>Volumen de extracto producido en cada año</i>	64

Capítulo 1

1. Introducción

1.1 Descripción del Problema

En los últimos 50 años Ecuador ha perdido alrededor del 70% del manglar debido a la tala indiscriminada de los bosques (Yépez, 2010). Se reporta que en el año de 1969 el manglar tenía un área de 203, 624 ha, 44 años después (en el 2013) el área de manglar se redujo a 157,094 ha (Carvajal & Santillán, 2019), esta destrucción del manglar ocasionada por la deforestación provoca la degradación de la faja costera y como consecuencia una baja calidad de vida de las comunidades ancestrales que subsisten de este ecosistema (Yépez, 2010). Debido a esto, organizaciones gubernamentales y no gubernamentales, en colaboración con países pertenecientes a las naciones unidas, trabajan en conjunto para la creación de proyectos que incentiven a la conservación del manglar mediante técnicas de maricultura (MAATE, 2019). Entre las técnicas propuestas para el desarrollo de sistemas sostenibles de maricultura está el cultivo y producción de macroalgas, debido a la gran cantidad de aplicaciones que han tenido en la última década en los campos de la medicina, cosmética, alimentos, etc. Entre las macroalgas propuestas para ser cultivadas se encuentra la especie *Acanthophora spicifera*, reconocida por su color rojo característico y su gran capacidad de adaptarse en climas tropicales y subtropicales.

Por lo antes expuesto y debido a la escasa información de la macroalga *Acanthophora spicifera* presente en las costas de Ecuador, surge la necesidad de investigar a mayor profundidad

su composición físico-química para lograr identificar compuestos bioactivos que permitan ser aplicados en la obtención de bioproductos. Con lo cual se pretende dar un valor agregado al cultivo de esta macroalga, y con ello lograr aportar a la sostenibilidad del proyecto “Desarrollo e Implementación Piloto de Sistemas de Maricultura que generen incentivos a la Conservación del Manglar”.

1.2 Justificación del Problema

Ecuador alberga alrededor del 10% de la biodiversidad del planeta, convirtiéndose en uno de los diecisiete países megadiversos del mundo. La tercera parte del territorio ecuatoriano corresponde a áreas declaradas como protegidas, mientras que el 51% se encuentra conformado por bosques nativos que durante muchos años han servido como hogar de pueblos ancestrales y comunidades que han dado prioridad al cuidado y conservación de los espacios forestales que habitan (ECOLAP & MAE, 2007). Sin embargo, ante el acelerado incremento de actividades antropogénicas, se ha llevado a cabo un proceso de deforestación de muchos ecosistemas que han sido fuentes de materia prima, alimentos y medicinas para las comunidades que los habitan.

Ante esta situación, países pertenecientes a la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMNUCC) han dado a conocer la preocupación mundial por la destrucción y pérdida de los bosques y su impacto en el cambio climático. Dando lugar a la creación de programas con el objetivo de abordar las causas de la deforestación y degradación de los bosques en Ecuador, y con ello crear proyectos que contribuyan a mitigar el cambio climático mediante acciones y medidas que permitan un desarrollo sostenible. Es así como surge el Plan de Acción de “Reducción de emisiones por deforestación y degradación forestal” REDD+ , el

mismo que es un resultado de la colaboración entre el Ministerio de Ambiente y Agua del Ecuador (actualmente Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica), con apoyo de instituciones gubernamentales, actores de la sociedad civil y la cooperación internacional. Con lo cual se busca estrategias que contribuyan a la reducción de la deforestación y degradación de bosques a través de la conservación, manejo forestal sostenible y la optimización de otros usos del suelo y mar para reducir la presión sobre los bosques (MAATE, 2020; MAATE et al., 2021).

Gracias a la cooperación entre los países de Alemania y Noruega quienes financian el programa REM – Ecuador: el cual es un programa de pagos por resultados para la reducción de emisiones por deforestación y degradación forestal; y que forma parte de los acuerdos alcanzados en la CMNUCC. Se busca reducir la deforestación e incentivar la implementación de sistemas sostenibles de producción agropecuarias, logrando con ello mantener o aumentar las reservas de carbono en los bosques (MAATE et al., 2021).

Uno de los componentes del programa REDD+ es la búsqueda de estrategias de bioeconomía, donde la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL) desempeña el papel del co-ejecutor en la implementación del proyecto “Desarrollo e implementación piloto de sistemas de maricultura que generen incentivos a la conservación del manglar” (DIPSIMAR), donde se ha propuesto abordar 5 objetivos para conseguir los resultados esperados del proyecto. Entre los cuales se encuentra; “implementar el prototipo de procesamiento de bioproductos derivados de macroalgas para su aplicación a nivel demostrativo” (MAATE, 2020).

Con el fin de lograr la obtención de bioproductos a partir de macroalgas presentes en las costas de Ecuador, se inicia con el estudio de caracterización físico-química de dos especies de

macroalgas *Acanthophora spicifera* y *Ulva s.p*, presentes la playa de San Pedro de Manglar Alto en la provincia de Santa Elena y en Puerto del Morro respectivamente (MAATE, 2020). En base a lo antes mencionado, este proyecto de investigación se enfoca en la extracción y cuantificación de flavonoides presentes en la macroalga *Acanthophora spicifera*. Esta macroalga ha sido objeto de varios estudios debido a la coloración rojiza que presenta, la misma que indica la presencia de compuestos fenólicos como lo son los flavonoides. Estos compuestos han sido ampliamente estudiados debido a su capacidad antioxidante, logrando demostrar múltiples beneficios en la salud humana como antiinflamatorios, anticancerígenos, reguladores metabólicos entre otras propiedades (Shoubaky et al., 2016; Luna-Guevara et al., 2018; Roleira et al., 2018; Zeng et al., 2001). Lo cual ha llamado la atención de la industria alimenticia e instituciones de salud pública debido a su potencial uso en la prevención de enfermedades crónicas. Por lo tanto, este estudio en conjunto con otras investigaciones conforma la base para determinar la viabilidad de potenciales bioproductos a partir de macroalgas presentes en las costas de Ecuador.

1.3 *Objetivos*

1.3.1 **Objetivo General**

Desarrollar un procedimiento de cuantificación de flavonoides mediante técnicas cromatográficas para la comparación de biomásas de macroalga *Acanthophora spicifera* recolectadas en diferentes meses del año.

1.3.2 **Objetivos Específicos**

- Aplicar técnicas de extracción de laboratorio para la obtención de un extracto a partir de la biomasa de la macroalga *Acanthophora spicifera*.
- Cuantificar el contenido de flavonoides en la biomasa de la macroalga *Acanthophora spicifera* mediante técnicas cromatográficas.
- Elaborar un protocolo de extracción y cuantificación de flavonoides a partir de biomasa de la macroalga *Acanthophora spicifera*.

1.4 *Marco teórico*

1.4.1 *Acanthophora spicifera*

En el mundo existen tres divisiones de macroalgas, las cuales se las puede diferenciar por sus colores distintivos. En primer lugar, se tiene a la *Chlorophyceae* o algas verdes, luego las *Rhodomelacae* o algas rojas y finalmente las *Phaeophyceae* o algas marrones (Anand et al., 2018). Además de su diferencia de colores cada una de estas familias presenta diferentes propiedades tanto físicas como químicas. Dentro de la familia de las *Rhodomelacae* está la macroalga *Acanthophora spicifera*, figura 1. Esta

macroalga crece hasta 25cm de alto y posee ramas cilíndricas de aproximadamente 0.6-3mm de ancho (Lewis, 2008). Crece tanto en temporada húmeda como seca y se distribuye por los océanos del trópico y subtrópico (Anand et al., 2018; Ávila et al., 2012). En Ecuador se conoce como temporada seca a los meses de junio a noviembre, la misma que se caracteriza por temperaturas bajas y lluvias escasas. Por otro lado, la temporada húmeda comprende los meses de diciembre hasta abril con temperaturas altas y lluvias abundantes (Jørgensen et al., 1999). La amplia proliferación de la macroalga se debe a su facilidad de regenerarse por fragmentación, su gran adaptabilidad en diferentes ecosistemas y su reproducción tanto sexual como asexualmente (Ávila et al., 2012).

Figura 1

Macroalga Acanthophora spicifera.



Nota: La imagen de la macroalga fue tomada en el CIBE luego de su respectivo lavado.

Además de su rápida proliferación, otra característica que poseen estas macroalgas es que tienen propiedades antioxidantes, debido a la presencia de diferentes metabolitos secundarios, lo que contribuye con la peroxidación lipídica de los alimentos (Guillén et al., 2022). La capacidad antioxidante se relaciona también con la capacidad que poseen los compuestos fenólicos de extraer metales pesados, actuando como un agente quelante (Roleira et al., 2018b). En la tabla 1 se menciona ciertos compuestos fenólicos reportados en la macroalga *Acanthophora spicifera*.

Tabla 1

Compuestos fenólicos presentes en la macroalga Acanthophora spicifera

Espece	Compuesto	Cantidad	Fuente	Aplicación	Referencia
<i>Acanthophora spicifera</i>	Acido cafeico	0.02mg	India	No se reporta	(Abirami & Kowsalya, 2016)
	Acido p-cumarico	0.02mg			
	Ácido galico	0.02mg			
	Ácido dihidroxibenzoico	0.01mg			
	Acanthophorin A	35mg	South China Sea	- Prevent lipid peroxidation.	(Zeng et al., 2001)
	Acanthophorin B	44mg		- Inhibit the generation of malondialdehyde in liver.	
	Catequina	50mg			
Quercetina	45mg				

1.4.2 Compuestos fenólicos

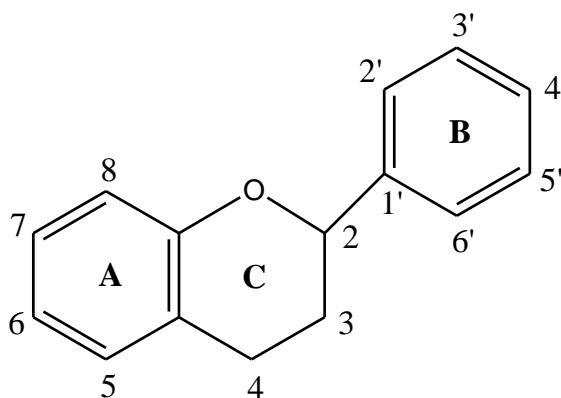
Actualmente existe una amplia variedad de compuestos que poseen en su estructura molecular uno o varios anillos fenólicos, los cuales son denominados polifenoles. La importancia en el estudio de estos compuestos radica en los beneficios que estos otorgan a la salud, capaces de evitar enfermedades crónicas, y demostrándose sus propiedades anticancerígeno, antiinflamatorias y anti-mutagénicas (Valls et al., 2009). Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y corresponden a uno de los más grandes grupos con altos contenidos de compuesto bioactivos, la gran mayoría de estos son ampliamente utilizados como antioxidantes naturales (Barba et al., 2014; Roleira et al., 2018a). Dentro de la clasificación de los polifenoles están los ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. En esta clasificación los más representativos son los flavonoides (Roleira et al., 2018b).

1.4.3 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular con estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicas. La estructura de los flavonoides consiste en dos anillos fenólicos (A y B) unidos mediante un anillo C de pirano heterocíclico como se puede observar en la figura 2. (Quiñones et al., 2012)

Figura 2

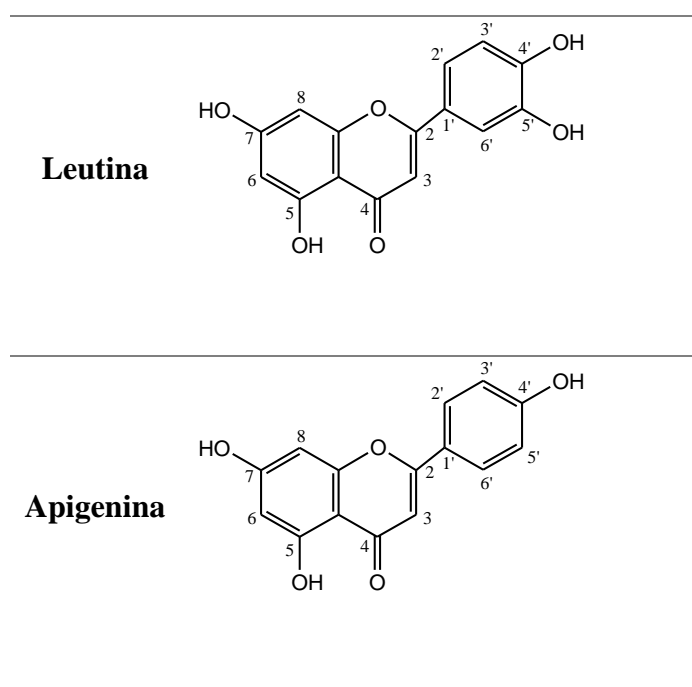
Estructura de la molécula de los flavonoides.



La clasificación de los flavonoides va a depender del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C), de los grupos hidroxilos, y de diferentes grupos funcionales presentes en esta molécula. Entre los principales flavonoides están: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas y flavanoles (Luna-Guevara et al., 2018; Quiñones et al., 2012).

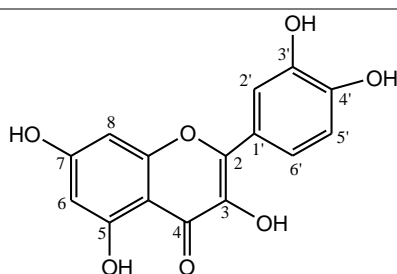
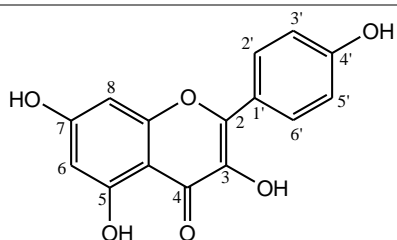
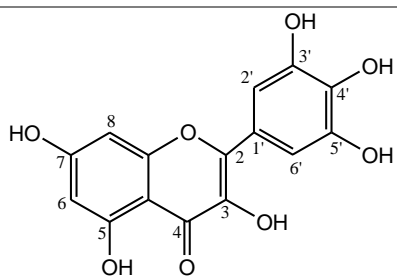
1.4.3.1 Flavonas

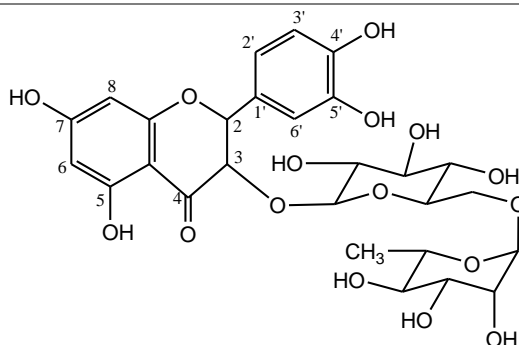
Las flavonas, también conocidas como 2-fenil-4-cromonas, son uno de los flavonoides más comunes del reino vegetal; y forman parte de los compuestos responsables de la pigmentación amarilla de flores, hojas de otoño y frutas. Debido a las constantes investigaciones acerca de flavonoides en el reino vegetal, una amplia cantidad de flavonas han sido identificadas y se observan las más representativas en la tabla 2 (Prieto & Aguilera, 2016).

Tabla 2*Estructura molecular de flavonas más representativas*

1.4.3.2 Flavonoles

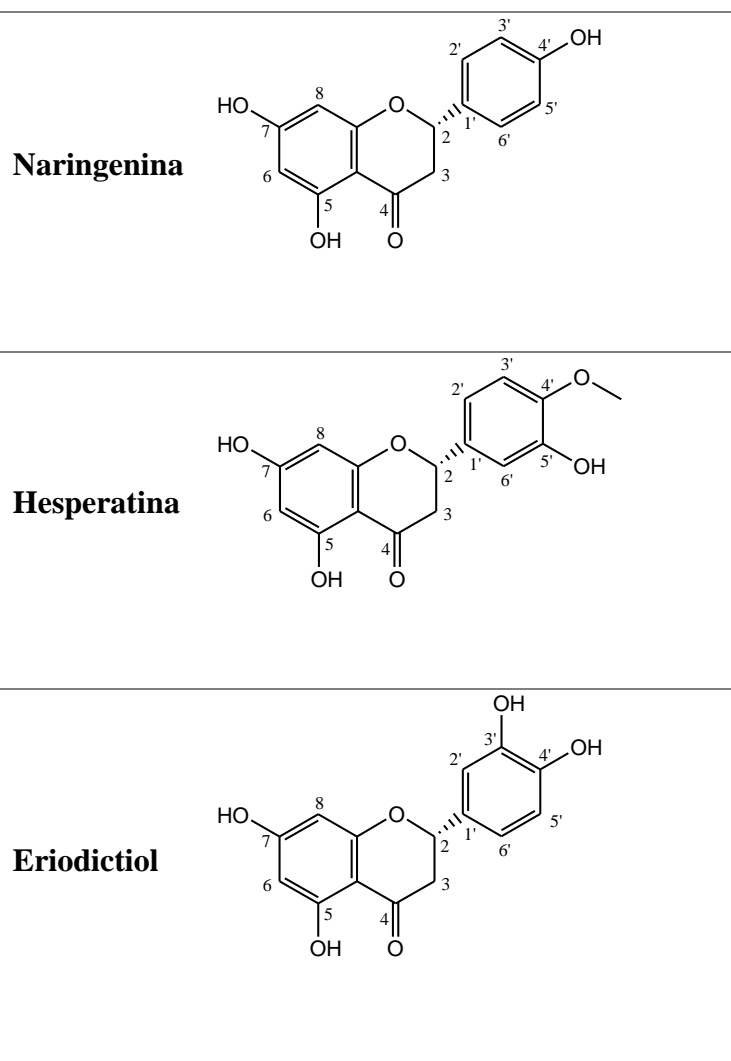
Existe una gran variedad de flavonoles que se dan por diferentes sustituciones de los anillos heterocíclicos y del benceno. Al igual que las flavonas, se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son uno de los responsables de la pigmentación amarilla de ciertas frutas y hojas. Entre los compuestos más representativos se tiene a la quercetina, kaempferol y miricetina. Se puede observar la estructura de estos compuestos en la tabla 3 (Luna-Guevara et al., 2018).

Tabla 3*Estructura molecular de los flavonoles más representativos***Quercetina****kaempferol****Miricetina**

Rutina

1.4.3.3 Flavanonas

Son minoritarias en alimentos y suelen ser incoloras, sin embargo, sus pequeñas concentraciones se localizan mayoritariamente en la parte sólida de la fruta. Al encontrarse en pequeñas cantidades no han sido muy estudiadas. Entre las más representativas están la naringenina, hesperatina y el eriodictiol (Quiñones et al., 2012).

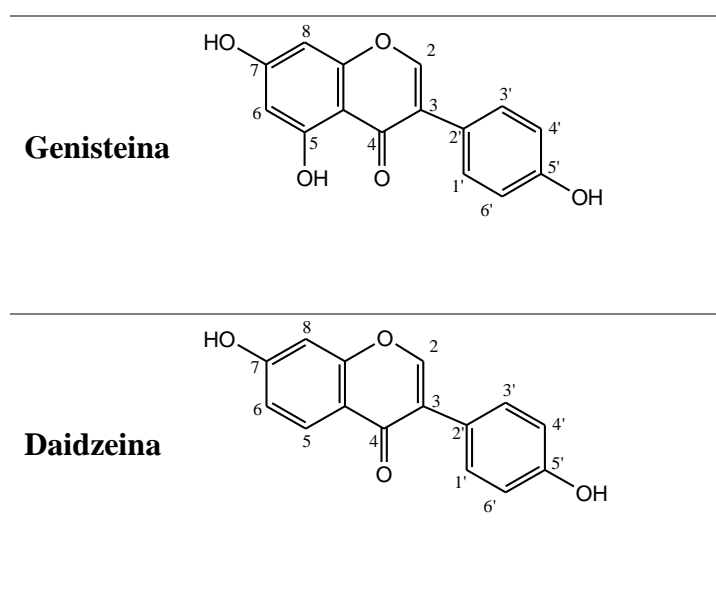
Tabla 4*Estructura molecular de las flavanonas más representativas*

1.4.3.4 Isoflavonas

Suelen presentarse como agliconas o conjugadas con glucosa. Entre sus principales características esta su termo sensibilidad y que pueden hidrolizarse durante su procesamiento industrial y su conservación. Entre las más conocidas se tiene a la genisteína y la daidzeína (tabla 5) (Quiñones et al., 2012).

Tabla 5

Estructura molecular de las isoflavonas más representativas



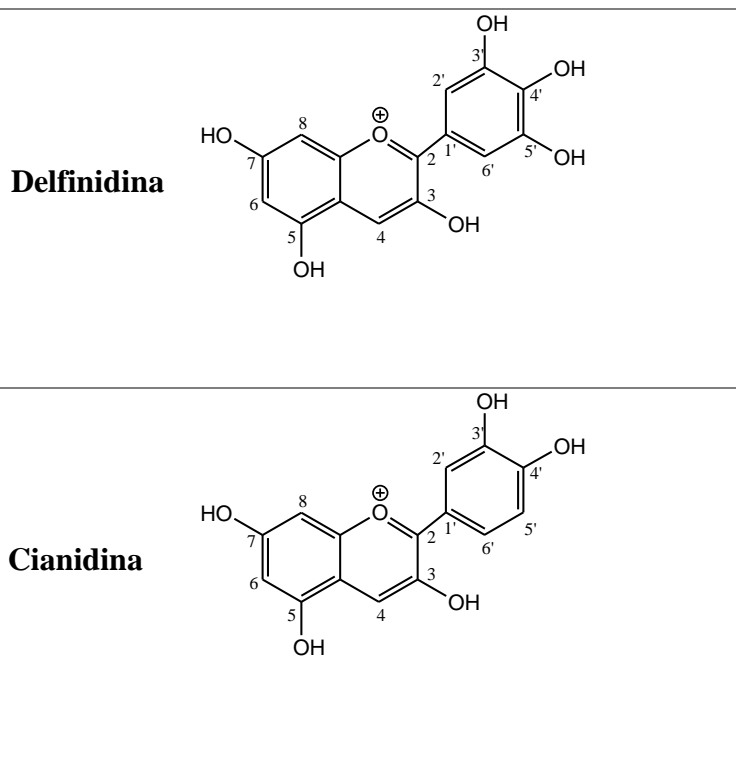
1.4.3.5 Antocianinas

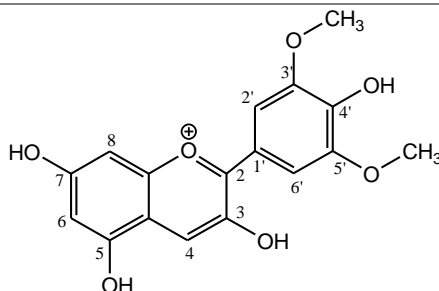
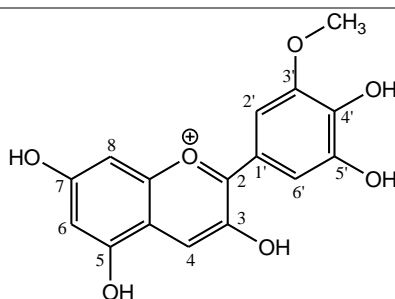
Constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales y están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Las más representativas son las

delfinidinas, cianidinas, malvidinas y la petunidina. Las concentraciones más altas de antocianinas han sido encontradas en frutas como la uva, las cerezas, ciruelas, berenjenas, entre otros, donde estos compuestos imparten la pigmentación rojiza de la mayoría de estas frutas (tabla 6) (Luna-Guevara et al., 2018).

Tabla 6

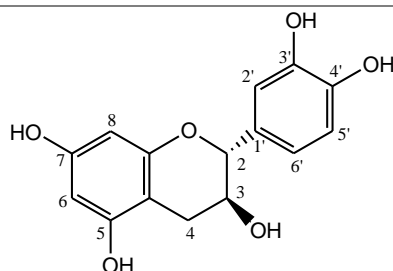
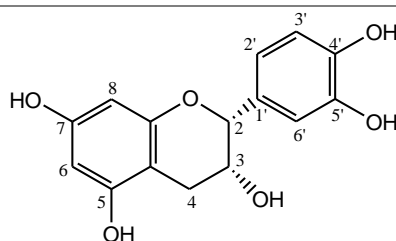
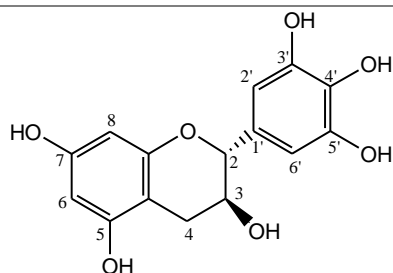
Estructura molecular de las antocianinas más representativas

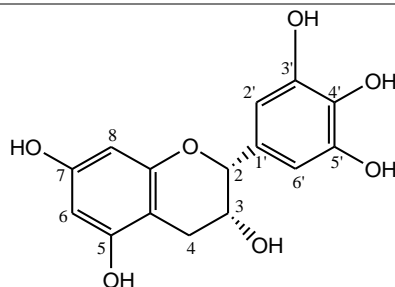
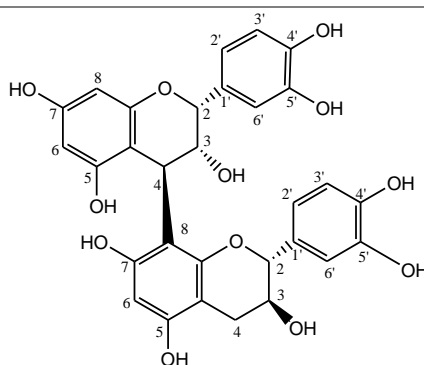


Malvidina**Petunidina**

1.4.3.6 Flavanoles

Estos flavonoides pueden aparecer como monómero o polímero dependiendo su grado de despolimerización. Los más representativos de este grupo son los de tipo flavan-3-ol. Normalmente existen como aglicones o esterificadas con ácido gálico como la catequina, la cual es un monómero. Sin embargo, también aparecen como oligómeros, como la procianidina, o como polímeros (proantocianidinas o taninos condensadas)(Quiñones et al., 2012). En la tabla 7 se encuentra la estructura molecular de los flavanoles más representativos.

Tabla 7*Estructura molecular de los flavanoles más representativas***(+)-Catequina****(-)-Epicatequina****(+)-Galocatequina**

(-)-Galoepicatequina**Procianidina B2**

1.4.4 Aplicaciones de flavonoides

En la actualidad existen varias investigaciones acerca de las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos provenientes de distintas fuentes, como es el caso de los extractos de plantas. Ha sido reconocido que un gran contenido de polifenoles en estos extractos se relaciona con actividad anticancerígena (Cartaya & Reynaldo, 2001). En el estudio de Roleira (2018), se puede observar algunos ejemplos de ciertos extractos, como es el caso de la *Ardisia crenata* que contiene rutina y ha sido demostrada su acción en contra del cáncer de hígado (pp.119-124). Las distintas aplicaciones en el

ámbito farmacológico van a depender de la estructura de cada molécula. Entre sus aplicaciones medicinales se destaca su actividad sobre el sistema circulatorio, su uso como antiinflamatorio, como antioxidante, antialérgico y antimicrobiano. Por otro lado, los flavonoides en la cosmética pueden disminuir la hiperpigmentación de la piel y también poseen actividad desodorante (Cartaya & Reynaldo, 2001).

Capítulo 2

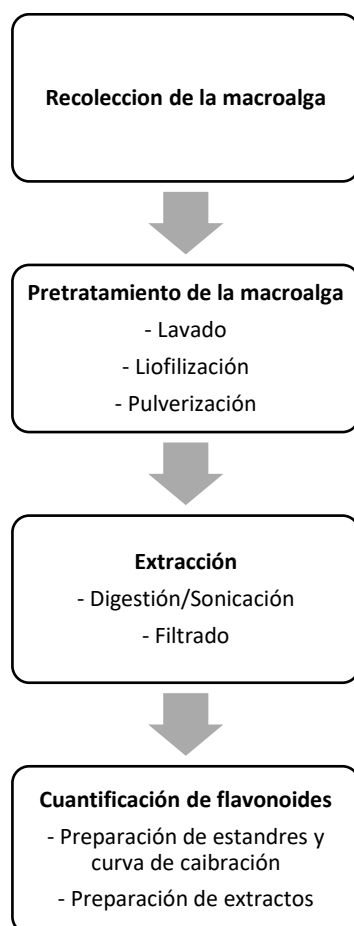
2. Metodología

2.1 Esquema de trabajo

A continuación, se presenta el esquema de trabajo que se siguió para cumplir con los objetivos propuestos (figura 3).

Figura 3

Esquema de trabajo



2.2 *Diseño de experimentos*

Para esta investigación se estableció un diseño de experimento en dos partes. La primera parte consiste en dos análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, el cual relacionó la variable dependiente (concentración de flavonoides) con la variable independiente (métodos de extracción). Con esto se determinó si existe una diferencia significativa entre los métodos de extracción con respecto a la concentración de analitos presentes en las muestras de macroalga recolectadas en septiembre del 2022 y enero del 2023 (tabla 8).

Tabla 8

*Variables del método de ANOVA de un factor, aplicada a cada uno de los meses de recolección de la macroalga *Acanthophora spicifera**

		Descripción
Variable Independiente		Método extractivo
Niveles	Variable Independiente	Digestión Etanólica 80%
		Sonicación Etanólica 80%
		Digestión Acuosa
Variable dependiente	Concentración total de flavonoides	

En la segunda parte se determinó la influencia que tienen los meses del año en la concentración de flavonoides. Esto se realizó mediante una prueba de diferencia de medias pareadas o prueba T-test para muestras dependientes, donde se determinó si existe

una diferencia significativa en la concentración de flavonoides presentes en la macroalga con respecto al mes en la que esta fue cosechada.

2.3 Cosecha y almacenamiento de la macroalga *Acanthophora spicifera*

Las muestras de algas fueron recolectadas en el Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas (CENAIM), ubicado en la comuna San Pedro (1°57'42.7"S 80°44'05.2"W), en la provincia de Santa Elena. Se realizaron dos cosechas de la macroalga en las fechas del 12 de septiembre del 2022 y el 09 de enero del 2023, las cuales fueron almacenadas bajo refrigeración en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

2.4 Pretratamiento de la macroalga

2.4.1 Lavado

Se descongelaron las muestras de macroalga para extraer impurezas manualmente, entre estas impurezas se encontró plantas epifitas, plásticos, pedazos de conchas, entre otras. Luego de esto se lavó la muestra dos veces con agua de la llave y finalmente con agua destilada. Una vez terminado el lavado se procedió a guardar la macroalga en fundas de plástico dentro del congelador del Laboratorio de Bioproductos.

2.4.2 Liofilización

Se colocaron las muestras de la macroalga dentro de los vasos para liofilizar de 100mL, 500mL y 1000mL. El equipo que se utilizó fue un liofilizador marca Labconco modelo Freezon 4.5 (figura 2), con una presión de 133×10^{-3} mbar, una temperatura de -

45 °C y durante una semana. Una vez secas las muestras de macroalga se almacenaron en un desecador hasta su posterior molienda.

Figura 4

Proceso de secado en equipo liofilizador de la macroalga.



2.4.3 Molienda

Para la molienda se utilizó un triturador de granos de café marca DAEWOOD, el mismo que se observa en la figura 3. Se colocó progresivamente la muestra liofilizada para no sobrecargar el triturador. Una vez molida toda la macroalga, se la almaceno dentro de fundas de plástico con cierre hermético en el desecador.

Figura 5

Triturador de granos



2.5 Extracción de macroalga *Acanthophora spicifera*

Se emplearon tres métodos de extracción diferentes por triplicado para observar que flavonoides se logran extraer.

2.5.1 Digestión con Etanol al 80%

Para este método de extracción se adaptó el método de (Valdez N., 2022) en donde se indican las condiciones óptimas para la extracción de flavonoides. Para la extracción se comenzó pesando 0.25g de la macroalga en peso seco y se le agregó 5mL de etanol al 80%. Luego, se calentó la muestra por 38 minutos a una temperatura de 43°C en una plancha de calentamiento marca IKA labor Technik modelo RCT basic. Una vez

que se terminó la digestión se procedió a montar un sistema de filtración al vacío (figura 6) para poder obtener el extracto final.

2.5.2 Sonicación con Etanol al 80%

En este método de extracción se colocó la muestra de macroalga seca y etanol al 80% en una relación de 0.25:5. Las condiciones de operación se las adapto de Kumar, 2020. La extracción se la realizo en un sonicador marca VWR ultrasonic cleaner por una hora y en un rango de temperatura de 24°C a 30°C. La temperatura fue aumentando debido al calor ultrasónico generado, es por esto que se apagaba el equipo cada 10 minutos para poder controlar la temperatura Finalmente, se filtró la muestra en el sistema de vacío que se observa en la figura 6.

Figura 6

Sistema de filtración al vacío.



2.5.3 Digestión con Agua

Para este método se realizó una adaptación del propuesto por Valdez, 2022. Se tiene una relación de peso de macroalga seca y solvente de 0.25:10, y se utiliza agua como solvente. Las condiciones de operación para la plancha de calentamiento fueron de 43°C por 38 min y una vez realizada la digestión de toda la muestra, se procedió a filtrar con un sistema de vacío (figura 6) para obtener el extracto final.

2.6 Cuantificación de compuestos flavonoides utilizando HPLC

La cuantificación de los flavonoides presentes en la macroalga *Acanthophora spicifera* se realizó en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución, conocido como HPLC por sus siglas en inglés. Las condiciones de trabajo empleadas para la cuantificación de flavonoides fueron adaptadas del trabajo de (Cai et al., 2011). El equipo utilizado fue un Arc HPLC marca Waters; el sistema se equipó con una bomba cuaternaria y una columna C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm tamaño de partícula) marca Agilent. El volumen de inyección del extracto fue de 20 µL. La separación de compuestos activos se llevó a cabo utilizando una fase móvil de: (A) Metanol y (B) 5mmol/L buffer de Dihidrógeno Fosfato de Potasio (20:80). La tasa de flujo de inyección de la fase móvil fue de 1mL/min, con temperatura de columna de 38°C. El gradiente de elución se programó como se indica en la tabla 9.

Tabla 9*Gradiente de elución de la fase móvil*

Tiempo	Flujo (mL/min)	A%	B%	Curve
	1.000	0.0	100	
5.00	1.000	20.0	80.0	6
10.00	1.000	50.0	50.0	6
15.00	1.000	50.0	50.0	6
19.00	1.000	80.0	20.0	6
20.00	1.000	0.0	100.0	6
23.00	1.000	0.0	100.0	6

2.6.1 Preparación de los estándares y curva de calibración

La investigación con el equipo HPLC fue basada en los siguiente siete estándares de compuestos pilifenólicos – flavonoides: (+)-catequina, procianidina B₂, procianidina C₁, (-)- epicatequina, rutina, quercetina y naringenina. De los cuales la procianidina B₂, procianidina C₁, (-)- epicatequina rutina, naringenina fueron adquiridos en Sigma – Aldrich®. Por otro lado, la (+)-catequina y quercetina se lo adquirió de USP®.

Se peso 1 mg de cada estándar dentro de tubos Eppendorf sobre una balanza analítica marca ISO-LAB (Laborgeräte GmbH), y se agregó 1mL de metanol grado HPLC para obtener una concentración de 1000 ppm de cada uno. Para garantizar la

homogeneidad de la solución, se procedió a agitar cada uno de los tubos en un agitador marca Vortex-Genie 2, para luego someterlos a sonicación durante 5 min. Posteriormente se preparó una muestra individual de cada uno de los estándares a una concentración de 10 ppm en 1 mL y se filtraron con un filtro de jeringa PVDF (0.2 μ m), para analizarlos en el equipo HPLC. Con esto se determinó los tiempos de retención de cada uno de los compuestos y la longitud de onda a la cual estos pueden ser leídos (tabla 10).

Tabla 10

Tiempo de retención de los estándares empleados y longitud de onda

Estándar	Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (nm)
(+)-Catequina	8.217	280
Procianidina B ₂	8.600	210
Procianidina C ₁	9.120	210
(-)-Epicatequina	9.623	280
Rutina	12.143	365
Quercetina	14.943	365
Naringenina	15.624	280

Una vez analizado cada estándar por separado, se procedió a realizar la curva de calibración para el método de cuantificación de flavonoides a partir de los estándares individuales de 1000 ppm. Se tomo una alícuota de 125 μ L de cada estándar y se trasvaso

a un matraz volumétrico de 5 mL, el cual fue aforado con metanol grado HPLC, para obtener una solución mix madre con concentración de 25 ppm. A partir de esta solución se formó cinco disoluciones a concentraciones de: 0.5, 1, 5, 10 y 15 ppm. Las mismas que fueron filtradas con un filtro de jeringa PVDF (0.2 μ m) y analizadas en el equipo HPLC logrando crear la curva de calibración para la cuantificación de flavonoides.

2.6.2 Análisis estadístico de la curva de calibración

Para determinar la linealidad de las curvas de calibración de cada estándar utilizado, se aplicó el modelo estadístico de regresión por mínimos cuadrados, donde se analizó la línea de tendencia o de regresión y su correlación lineal R^2 . Así como también, se realizó un análisis de varianza por medio del estadístico F, donde se planteó las siguientes hipótesis; hipótesis nula (H_0): No existe una relación lineal entre la variable explicativa (concentración del estándar) y la variable de respuesta (área de pico); hipótesis alternativa (H_1): existe una relación lineal ente las dos variables.

2.6.3 Preparación de los extractos

De los extractos obtenidos por triplicado, en cada una de las técnicas empleadas, se procedió a preparar la muestra para analizarlas en el equipo HPLC.

Para las muestras obtenidas en la digestión y por sonicación con etanol al 80%, se separó el solvente de la muestra haciendo uso de un rotovaporador marca Heidolph (Laborota 4001), donde se obtuvo un sólido de color verde adherido a las paredes del balón de destilación. Luego, se reconstituyó cada una de las réplicas en 2 mL de metanol

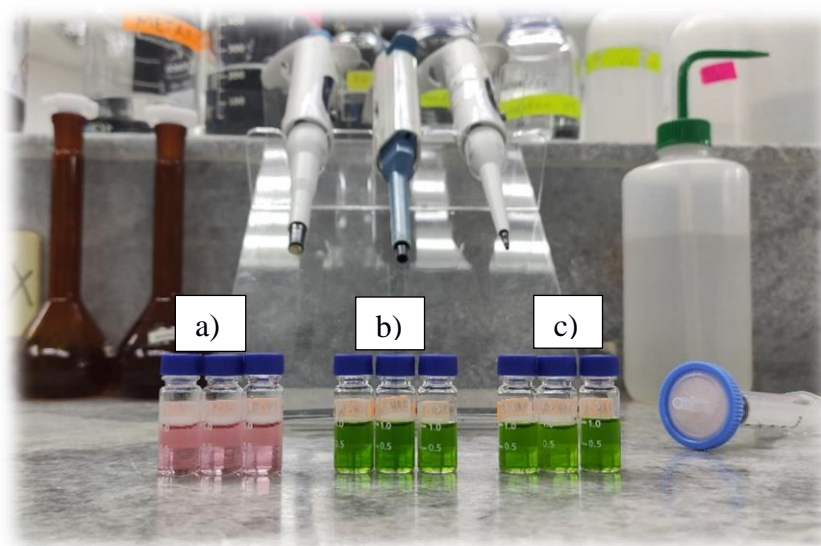
grado HPLC, se filtró con un filtro de jeringa PVDF ($0.2\mu\text{m}$) y se almacenó en viales para su posterior análisis como se puede observar en la figura 7.

Para las muestras obtenidas en las extracciones por digestión con agua, se tomó una alícuota de 1mL de cada una de las réplicas, se utilizó un filtro de jeringa PVDF ($0.2\mu\text{m}$), y se almacenó en viales HPLC.

Posteriormente se colocaron los viales con cada una de las muestras en el equipo HPLC con el fin de obtener los cromatogramas respectivos y compararlos con la curva de calibración para determinar la presencia de compuestos polifenólicos y su cuantificación

Figura 7

Viales cromatográficos HPLC con su respectivo extracto



- a) Extracto por digestión con agua (0.25:10); b) Extracto por digestión con etanol 80% (0.25:5) y
c) Extracto por sonicación con etanol 80% (0.25:5)

2.6.4 Cuantificación de flavonoides en los extractos

Para poder obtener los resultados de la concentración de los estándares analizados en las muestras tratadas de macroalga, se relacionó la curva de calibración de los estándares con el área del pico (respuesta del detector PDA) mediante la ley de Berr Lambert, la cual describe la relación entre la cantidad de luz de una longitud de onda particular que llega al fotodiodo y la concentración de la muestra que pasa a través de la celda de flujo (Waters, 2010). La ley de Beer-Lambert se expresa como $A = \epsilon lc$ donde:

A = cantidad adimensional medida en unidades de absorbancia.

ϵ = constante de proporcionalidad conocida como absortividad molar.

l = longitud de la trayectoria en centímetros (1,0 cm en cada celda de flujo normal de detector).

c = concentración en moles por litro.

2.7 *Elaboración de protocolos de laboratorio*

Una vez realizado todo el proceso de extracción de biomasa de la macroalga *Acanthophora spicifera* y la cuantificación de flavonoides en los extractos se procedió a realizar un protocolo para el laboratorio de bioproductos. El protocolo de laboratorio fue realizado de acuerdo con las directrices establecidas en la norma ISO IEC 17025 para laboratorios de ensayos y calibración.

En este protocolo primero se estableció el objeto de estudio del proyecto junto con alcance y aplicación. Luego se elaboró una breve introducción acerca del tema de la

práctica, en este caso de los flavonoides y del principio de la cromatografía líquida de alta resolución. También, se enlistaron todos los reactivos, materiales y equipos que se utilizaron, al igual que los procedimientos que se siguieron para poder obtener los extractos y la cuantificación de flavonoides. Dentro de estos procedimientos se especificó la preparación de los materiales a utilizar, los estándares y su curva de calibración, la fase móvil empleada, el manejo que se le debe dar a las muestras, la preparación de las muestras y finalmente su lectura en el HPLC. Además, se coló un análisis instrumental en donde se enlistaron las condiciones cromatográficas que se deben implementar para la cuantificación de flavonoides. En otro apartado se incluyeron los cálculos que se deben realizar para la preparación de soluciones buffer y estándares. Finalmente, se colocó las fuentes de donde se obtuvieron parte de los procedimientos realizados y los aspectos relacionados con la seguridad laboral.

Capítulo 3

3. Resultados y Análisis

3.1 Análisis de estándares y curva de calibración

Para el análisis realizado en el equipo HPLC de los siete estándares de flavonoides correspondientes a; (+)-Catequina, Procianidina B2, Procianidina C1, (-)- Epicatequina, Rutina, Quercetina y Naringenina. Se logró determinar el tiempo de retención de cada uno de los estándares con su respectivo perfil de concentraciones, tal como se representa en el anexo 1. Se puede observar que cada compuesto posee un tiempo de retención específico, el cual es resultado de la interacción intermolecular entre los compuestos transportados por la fase móvil, de naturaleza polar, y el material de relleno de la columna cromatográfica C18 de naturaleza no polar (García de Marina Bayo & Yusá Marco, 2016). Logrando de esta forma separar los compuestos para su respectiva identificación y posterior comparación con las muestras de macroalga *Acanthophora spicifera*.

Al leer cada uno de los puntos de la curva de calibración en el equipo HPLC, bajo las condiciones de operación mencionadas en el apartado de metodología, se obtuvo gráficas de *Concentración vs Área del pico (Respuesta del equipo PDA)* para cada uno de los estándares utilizados. Al realizar el tratamiento estadístico de los datos, por regresión de mínimos cuadrados, se obtiene una correlación lineal $R^2 \geq 0.98$ en todos los casos como se puede observar en el anexo 2. Lo cual indica que el 98% de la variación de las

áreas de pico de una muestra analizada puede tener una buena aproximación en el intervalo de concentración de los estándares conformados. Por otro lado, en el análisis de varianza por medio del estadístico F, se planteó como hipótesis nula (H_0): que no existe una relación lineal significativa entre la variable explicativa (concentración del estándar) y la variable de respuesta (área de pico), frente a la hipótesis alternativa (H_1): existe una relación lineal significativa entre las dos variables. Para todos los estándares, a un nivel de significancia $\alpha = 5\%$, se obtiene un valor $p \ll 0.05$ que permite inferir que existe suficiente evidencia estadística para determinar una relación lineal entre la concentración del estándar y el área de pico (respuesta del detector PDA).

3.2 *Extractos de macroalga*

Se obtuvieron los rendimientos de peso seco de la digestión etanólica y la sonicación etanólica, para la macroalga recolectada en los dos meses. En la tabla 11 se presentan los rendimientos antes mencionados, siendo el más alto el de la digestión etanólica en enero del 2023. Aun así, estos rendimientos son sumamente bajos lo que dificultaría la venta de extractos secos de esta macroalga. Es por esto que el precio de los flavonoides en base seca tiende a ser elevado, más aún cuando se tiene una pureza alta.

Un factor que pudo afectar a los cálculos de los rendimientos es el error instrumental de los matraces de balón y de la balanza analítica que se utilizó. Al tratarse de cantidades tan pequeñas de extracto en base seca, la medición de la balanza analítica que se utilizó no será tan precisa por lo que se pueden observar desviaciones estándares sumamente altas en los resultados obtenidos.

Tabla 11

Rendimiento en peso seco del extracto de la macroalga.

Rendimiento %	Digestión etanolica	Sonicación etanolica
Septiembre	0.80 ± 0.32	0.81±0.40
Enero	1.159±0.26	0.86±0.82

Por otro lado, el rendimiento en peso seco de la extracción acuosa no se puede determinar debido a que no se recomienda rotoevaporar soluciones acuosas. Esto se debe a que el agua tiene un punto de ebullición alto y necesitaría de presiones más bajas que las alcanzadas por la bomba de vacío del laboratorio. Por lo que se procedió a determinar el rendimiento de esta extracción con la cantidad de filtrado líquido que se obtuvo. De esta forma se tiene un rendimiento del 52% para la macroalga del mes de septiembre y 40.71% para la macroalga del mes de enero. Gracias a estos rendimientos fue posible estimar una producción a escala industrial del proceso extractivo de la macroalga *Acanthophora spicifera*.

3.3 Análisis de resultados de la cuantificación

Las concentraciones de los analitos en la muestra fueron determinadas a partir de la ley de Beer-Lambert, la cual relaciona el área del pico con la concentración de los estándares. De esta forma se logró obtener la concentración de los compuestos de interés en miligramos por kilogramo de macroalga en peso seco.

3.3.1 Macroalga recolectada en septiembre del 2022

De los extractos que se obtuvieron de la macroalga cosechada en septiembre, se logró extraer cinco de los siete flavonoides analizados. La extracción de estos flavonoides se da debido a la semejanza con la polaridad de los solventes, siendo el agua y el etanol solventes polares tendrán una solubilidad moderada con respecto a los flavonoides de carácter polar (rutina, quercetina, catequina, procianidina B2 y epicatequina) (Cartaya & Reynaldo, 2001). En la tabla 12 se puede observar que la extracción acuosa es la que tiene una mayor concentración de estos compuestos, con un total de flavonoides de 30.656 mg/kg de macroalga seca (b.s). Esto se debe a la afinidad que posee el agua con una gran cantidad de compuestos. La rutina al ser un flavonoide o-glucósido tiende a ser más soluble en agua, por lo que se la encuentra en una concentración más alta en el extracto acuoso que en los etanólicos (Cartaya & Reynaldo, 2001; Mendoza Wilson, 2006). El otro compuesto que se puede observar en esta extracción es la catequina debido a que es soluble en medios acuosos (Lopez Gil, 2013). El ultimo compuesto que se encontró en la extracción acuosa fue la procianidina B2. Sin embargo, no pudo ser cuantificada ya que su concentración se encontraba por debajo de los valores de la curva de calibración.

En las extracciones etanolicas se obtuvieron resultados similares entre la digestión y la sonicación, como se puede observar en la tabla 12. Sin embargo, en la digestión etanolica se obtuvieron 6.72 mg/kg b.s de epicatequina y en la sonicación no se detectó este compuesto. La ausencia de la epicatequina en la sonicación etanolica se puede dar

por las altas frecuencias y tiempos prolongados a la que se somete a las moléculas. Estas frecuencias causan cambios de presión que forman burbujas de vapor y al estallar provocan la disrupción de la membrana celular, lo cual se conoce como fenómeno de cavitación (Bermudez Serra, 2012; Bhadange et al., 2022). Por otro lado, la presencia de pequeñas concentraciones de rutina en los extractos etanolicos al 80% se debe a que, como se mencionó anteriormente, la rutina es un flavonoide o-glucósido que posee una gran afinidad con el agua, y las pequeñas cantidades de esta en el solvente aun lograron arrastrar la rutina. Otro compuesto que se puede observar en los dos extractos etanolicos es la quercetina, varios estudios demuestran que al aumentar la concentración del etanol en una mezcla de etanol agua como solvente, se tendrá una mayor solubilidad con respecto a la quercetina (Abraham & Acree, 2014; Razmara et al., 2010). Finalmente, el ultimo compuesto que se detectó en las extracciones etanolicas fue la procianidina B2, este compuesto al ser un dimero posee un peso molecular alto. Según (Poncet-Legrand et al., 2003) en su estudio acerca de la agregación de flavan-3-ol en soluciones etanolicas, los taninos con pesos moleculares más elevados tienden a precipitarse a ciertas concentraciones. Por lo que se asume que la procianidina B2 se precipito en las extracciones etanolicas y se quedó en la fase solida al momento de filtrar al vacío. Con todo lo mencionado anteriormente se obtuvieron concentraciones totales de flavonoides para la digestión etanolica y la sonicación etanolica de 16.66mg/kg b.s. y 8.451mg/kg b.s. respectivamente.

Tabla 12

Cuantificación de flavonoides en extracto de macroalga Acanthophora spicifera del mes de septiembre del 2022.

Compuesto (mg/kg)	Digestión	Digestión	Sonicación
	acuosa	etanolica	etanolica
Rutina	15.36 ± 0.541	3.034 ± 0.017	5.495 ± 0.110
Quercetina	ND	5.515 ± 0.131	2.956 ± 0.152
Naringenina	ND	ND	ND
Catequina	14.82 ± 1.086	ND	ND
Procianidina B2	NC	1.389 ± 0.411	NC
Procianidina C1	ND	ND	ND
Epicatequina	ND	6.721 ± 0.084	ND
Concentración de flavonoides totales	30.656	16.660	8.451

NC: No cuantificable; ND: No detectado.

3.3.2 Macroalga recolectada en el mes de enero del 2023.

De forma similar a las extracciones de septiembre, en el mes de enero la extracción acuosa logro extraer una mayor concentración de flavonoides, con un valor total de 26.59 mg/kg b.s. Por otro lado, la digestión y sonicación etanolica obtuvieron concentración de flavonoides totales de 9.36 mg/kg b.s y 9.017 mg/kg b.s

respectivamente. La concentración de cada flavonoide se los puede observar en la tabla 13.

Tabla 13

Cuantificación de flavonoides en extracto de macroalga Acanthophora spicifera en enero del 2023.

Compuesto (mg/kg)	Digestión acuosa	Digestión etanolica	Sonicación etanolica
Rutina	15.095 ±1.067	2.830±1.399	2.878±0.066
Quercetina	ND	5.570±0.070	5.433±0.017
Naringenina	ND	ND	ND
Catequina	11.495±0.274	ND	ND
Procianidina B2	NC	0.961±0.417	0.706±0.598
Procianidina C1	ND	ND	ND
Epicatequina	ND	ND	ND
Concentración de flavonoides totales	26.590	9.360	9.017

NC: No cuantificable; ND: No detectado.

En la tabla 14, se pueden observar que los flavonoides que se extraen en el mes de enero son similares a los que se obtuvieron en septiembre. Sin embargo, la epicatequina que se obtuvo en la digestión etanolica para el mes de septiembre no se detectó en enero. Esto pudo ocurrir debido a que los flavonoides se ven afectados por las condiciones ambientales (Quiñones et al., 2012). Se ha reportado en varios estudios que la concentración de los pigmentos de varias familias de algas disminuye en temporadas

calientes y aumenta en temporadas frías (Marinho et al., 2019; Schmid et al., 2017; Stengel & Dring, 2019). Esta disminución de los pigmentos puede significar una menor concentración de los flavonoides, ya que se conoce que estos compuestos son responsables de la pigmentación de algunas algas (Quiñones et al., 2012).

Tabla 14

Flavonoides detectados en cada extracción en dos meses del año.

Flavonoides	Digestión Acuosa		Digestión Etanólica		Sonicación Etanólica	
	Septiembre	Enero	Septiembre	Enero	Septiembre	Enero
Rutina	+	+	+	+	+	+
Quercetina	-	-	+	+	+	+
Naringenina	-	-	-	-	-	-
(+)-Catequina	+	+	-	-	-	-
Procianidina B2	+	+	+	+	+	+
Procianidina C1	-	-	-	-	-	-
Epicatequina	-	-	+	-	-	-

(+): Presencia del flavonoide

(-): Ausencia del flavonoide

3.3.3 Comparación entre los meses de recolección de la macroalga

En la tabla 15 se puede observar la diferencia entre la concentración total de los flavonoides detectados para cada una de las extracciones en los dos meses del año. Se puede observar que en septiembre se tiene concentraciones más altas que en enero. En el caso de la digestión acuosa y la sonicación etanólica los valores de concentración final en ambos meses no difieren mucho, sin embargo, para la digestión etanólica se tiene un

valor de 16.660 mg/kg b.s en septiembre y para enero la concentración total baja a 9.36 mg/kg b.s. Esta disminución de la concentración de flavonoides se ve afectada por la ausencia de epicatequina en la digestión etanólica del mes de enero.

Tabla 15

Flavonoides totales detectados en la macroalga Acanthophora spicifera en dos meses diferentes.

Flavonoides totales detectados (mg/kg)	Digestión acuosa	Digestión etanólica	Sonicación etanólica
Septiembre	30.656 ± 0.727	16.660 ± 0.596	8.451 ± 0.343
Enero	26.590 ± 1.274	9.360 ± 0.352	9.017 ± 0.675

Valor $p \ll 0.5$ para la comparación entre los métodos de extracción con una prueba ANOVA con significancia $\alpha = 5\%$

Valor $p < 0.5$ para la comparación entre los meses del año con una prueba T-test con significación $\alpha = 5\%$

3.4 Tratamiento estadístico de los datos

Para lograr determinar el método de extracción más adecuado en la obtención de flavonoides, se realizó un análisis estadístico con los datos obtenidos en el equipo HPLC. Para ello se planteó dos análisis de varianza (ANOVA) de una vía donde se asume que la concentración de los flavonoides analizados en las muestras de macroalga, tanto en el mes de septiembre como en enero, dependerán del método de extracción aplicado anexos 3 y 4. Para ambos análisis, la hipótesis nula indica que H_0 : No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de concentración de Flavonoides cuantificados en los tres métodos de extracción, contrastada por la hipótesis alternativa que indica que H_1 : Sí existe diferencia

entre las medias de concentración de Flavonoides cuantificados en los tres métodos de extracción. Para los resultados por triplicado de la cuantificación en los tres métodos de extracción, ANOVA da como resultado un valor $p \ll 0.05$ lo cual que permite rechazar la hipótesis nula e inferir con un 95% de confianza que si existe diferencia significativa entre la concentración de los flavonoides cuantificados en los tres extractos obtenidos. De igual forma para la muestra de macroalga recolectada en el mes de enero, se infiere que existe una diferencia entre la concentración de los flavonoides analizados con respecto al método de extracción.

Con lo mencionado anteriormente y en base a la suma de los flavonoides detectados en cada extracto, se infiere que la digestión de macroalga en agua permite obtener una mayor concentración de flavonoides, logrando extraer en promedio una cantidad de 30.656 ± 0.727 y 26.590 ± 1.274 mg/kg b.s para las muestras del mes de septiembre y enero respectivamente (tabla 15).

Dada la dependencia de la experimentación realizada sobre la macroalga con respecto a la cuantificación de flavonoides en septiembre y enero. Se opto por realizar una prueba de medias de los resultados obtenidos en las extracciones acuosas, la cual se escogió como la más adecuada, donde se tiene como hipótesis nula que H_0 : No existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de concentración de flavonoides en los meses que se ha recolectado, frente a la hipótesis alternativa que dice H_1 : Existe diferencia significativa entre las medias de concentración de flavonoides en la macroalga recolectada en los meses de septiembre y enero. Con un nivel de confianza del 95%, se obtuvo un valor $p < 0.05$ que nos permite inferir que existe suficiente evidencia estadística para determinar que la concentración de flavonoides

en la macroalga *Acanthophora spicifera* será mayor en el mes de septiembre que en enero (anexo 5).

3.5 *Protocolo de laboratorio*

Para este protocolo de laboratorio se describió detalladamente cada uno de los procesos que se deben realizar para la obtención de extractos de la biomasa de una macroalga y su respectiva cuantificación de flavonoides. El protocolo que se realizó fue el siguiente: Procedimiento de extracción y cuantificación de flavonoides mediante HPLC (anexo 6).

Al seguir las directrices de las normas ISO IEC 17025 para realizar el protocolo se deja una guía para la validación del método de extracción y cuantificación de flavonoides mediante HPLC. Por lo que si el laboratorio está interesado en validar el proceso podría analizar cuáles son los puntos que tendrían que implementar.

3.6 *Análisis económico*

Para el análisis económico se realizó un esquema de flujo del proceso de extracción de la macroalga con equipos industriales. El mismo que se puede observar en la figura 8, el esquema comienza con la recepción de la macroalga y su respectivo lavado. Luego, se tiene un horno donde se seca la macroalga cruda y un triturador para obtener el polvo seco de la macroalga. El material seco se lo introduce a un digestor con agitación continua y chaqueta de calentamiento para finalmente pasarlo a un filtro duplex y obtener el extracto. Aparte de los equipos para el proceso de extracción, también es

necesario un refrigerador con capacidad de 500kg para mantener la materia prima a una temperatura de -4 C.

Figura 8

Esquema de flujo del proceso de extracción de la macroalga a nivel industrial.



Al realizar el análisis de costos de los equipos industriales, se obtuvo un gasto de constitución de \$121,065. En este valor se incluyen los costos de cada equipo, los cuales se pueden observar en la tabla 16, y también el valor de la instalación de los mismos que son el 75% del costo del equipo (Turton et al., 2008). Al tener este valor de gastos de constitución se necesitaría una inversión de \$122,000 para poder iniciar el proyecto.

Tabla 16

Precio de los equipos para el proceso industrial de extracción.

Equipo	Precio	Precio de instalación
Horno	\$7,740	\$5,805.00

Triturador	\$7,500	\$5,625.00
Reactor	\$11,400	\$8,550.00
Filtro duplex	\$1,440.00	\$1,080.00
Refrigerador	\$41,100	\$30,825.00

En el primer año de operación se comienza con la venta del extracto, con un precio de \$3 por litro. El cual se ha considerado por la cantidad de flavonoides presentes en el extracto y, los cálculos de costo unitario y precio de venta que se encuentran en el anexo 7. Para estos cálculos se consideró un margen de ganancia del 50%. De esta forma el precio del producto se encontraría por debajo del precio de productos con flavonoides existentes en el mercado. Una vez obtenido el precio al que se venderá el extracto se estimó que la producción en el primer año sería de 44,885.02 L. Para la determinación de la producción anual de extracto se tomó en cuenta sólo la extracción acuosa, ya que presento concentraciones mayores de flavonoides en ambos meses. Al conocer el rendimiento del extracto líquido a escala laboratorio, se estimó que se tratarían 15kg de macroalga en base seca con 40L de agua. Con un rendimiento del 52% en el proceso de extracción, se obtendrían 28.37L por digestión y 170L de extracto por día si se estima que se realizaran seis digestiones en cada jornada laboral.

Sin embargo, para poder alcanzar esa producción se tendrían los siguientes costos variables que se pueden observar en la tabla 17. Para determinar el consumo de energía eléctrica se sumó los kWh que cada equipo consume y se multiplico por las horas de

trabajo. Además, se consideró que el refrigerador y el horno son equipos que deben mantenerse encendidos, por lo que se debe multiplicar su consumo de kWh por 24 horas. En segundo lugar, tenemos el consumo de agua, donde se tuvo en cuenta que esta será utilizada como solvente de la digestión, estimando un consumo de 63.36m³ en el primer año. Como tercer punto, se estimó que el precio de la materia prima sería de 0.85 \$/Kg de macroalga, el cálculo se realizó considerando las horas de trabajo que toman cuatro personas en recolectar la macroalga y el transporte de la misma. Finalmente, se cotizó el precio al por mayor de envases color ambar en presentación de 1 L, con lo cual se estima que el costo de cada botella es de 0,67\$. De esta forma la suma de los costos variables da un valor total de \$57,967.42 en el primer año, según el análisis realizado.

Tabla 17

Costos variables en el primer año.

Costos variables	Precio (\$/año)
Energía	7,419.46
Agua	132.46
Materia prima	20,219.50
Compra de envases	57,967.42

Luego tenemos los costos fijos, en los cuales se considera el salario de los ingenieros y operadores de la planta. Para el proceso de extracción se necesitarían siete operadores, tres para el área de lavado de la macroalga, uno que controle el horno y triturador, otro que controle el reactor y filtro dúplex, y dos operadores más para el área de envasado. Dentro de los costos fijos también tenemos el mantenimiento de los equipos. Todos estos costos se detallan en la tabla 18, y darían un valor total de \$77,900 en el primer año.

Tabla 18

Costos fijos en el primer año.

Costos fijos	Precio (\$/año)
Operadores	44,100
Ingenieros	28,800
Mantenimiento	5,000

La suma de los costos fijos más los costos variables son los egresos que tendrá la empresa en cada año, los cuales se pueden observar en el flujo de caja en el anexo 8. Para poder recuperar la inversión inicial en el cuarto año se debe aumentar la producción del extracto gradualmente, los volúmenes de extracto producido en cada año se los puedes observar en la tabla 19.

Tabla 19

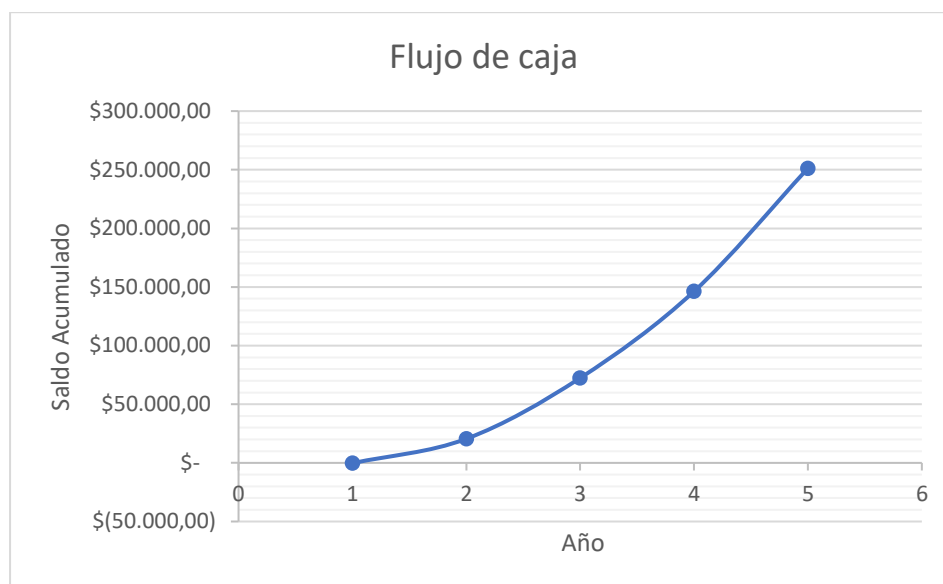
Volumen de extracto producido en cada año.

Año	Producción de extracto (L)
1	44,885.02
2	57,126.39
3	73.448,21
4	85,689.58
5	102,011.41

Con estos valores se recupera la inversión inicial en el cuarto año y para el quinto ya se tendría ganancia neta. Esto demuestra la viabilidad del proyecto para la producción de un extracto de la macroalga *Acanthophora spicifera*. Además, en la figura 9 se puede observar que se espera un crecimiento exponencial de las ganancias acumuladas con respecto a los años de funcionamiento de la planta.

Figura 9

Flujo de caja del proceso de extracción de la macroalga Acanthophora spicifera.



Capítulo 4

4. Conclusiones y Recomendaciones

4.1 Conclusiones

Luego de realizar los métodos de extracción, cuantificación y procesamiento estadístico, en la determinación de los flavonoides presentes en extractos de macroalga *Acanthophora spicifera*, mediante la cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución HPLC la evidencia presentada demuestra que:

- Se realizaron tres extracciones sólido-líquido distintas para la obtención del extracto de biomasa de la macroalga. Para las extracciones con etanol al 80% se utilizó una relación de masa seca con respecto al solvente de 0.25:5 con lo que se obtuvo un rendimiento en el mes de septiembre de 0.80 ± 0.32 % en la digestión y 0.81 ± 0.40 % en la sonicación. Para los extractos de enero también se obtuvieron rendimientos bajos, siendo estos de 1.159 ± 0.26 % para la digestión y 0.86 ± 0.82 % en la sonicación. Estos rendimientos tienen una desviación estándar demasiado alta debido a que se trataron pesos tan bajos que la precisión de la balanza analítica se vio afectada. Por otro lado, el rendimiento del peso líquido de la extracción acuosa fue de 52% para el mes de septiembre y de 40.71% en enero. Estos rendimientos se deben a que la *Acanthophora spicifera* está constituida en

su gran mayoría por líquido y al momento de utilizar agua como solvente esta macroalga absorbe gran cantidad del mismo. De acuerdo con estos rendimientos es más fácil realizar una extracción acuosa para la obtención de un extracto líquido que realizar extracciones etanolicas para la obtención de extractos secos. Con esta información obtenida, y debido a la escasa investigación acerca de sistemas de producción de extractos de esta macroalga, se aplicó estos datos en la estimación de la producción de extracto acuoso a pequeña escala, con lo cual se estimó que existe viabilidad en la implementación de un proceso industrial para la producción de extractos ricos en flavonoides a partir de la macroalga, tal como se demuestra en el anexo 8.

- La concentración de los flavonoides analizados en la macroalga se ve afectado por la técnica de extracción utilizada y por el mes en la que fue recolectada el alga. Con lo cual, en base a tratamientos estadístico de los resultados, se afirma que la extracción con solvente agua en relación (0,25:10) es la más indicada para obtener mayor concentración de compuestos flavonoides, dando como resultado una cantidad de 30.656 ± 0.727 y 26.590 ± 1.274 mg/ kg b.s para el mes de septiembre y enero respectivamente. Por otro lado, la macroalga recolectada en septiembre demuestra una mayor concentración de flavonoides, con lo cual se determina que habrá una diferencia estadísticamente significativa con respecto a al mes del año en la cual se recolecte la macroalga. Debido a la escasa investigación acerca de la macroalga *Acanthophora spicifera* este estudio aporta con información de gran

valor para la futura determinación de la biodisponibilidad de esta alga en la obtención de bioproductos de alto valor agregado.

- Una vez realizada la extracción y cuantificación de flavonoides, se recolecto toda la información para poder realizar un protocolo de laboratorio para futuros ensayos. El protocolo planteado se basa en las directrices establecidas por las normas ISO IEC 17025. Sin embargo, se reserva el derecho a la reproducción total y distribución de este documento por motivos de propiedad intelectual.

4.2 Recomendaciones

- Para un mejor análisis acerca de la influencia de los meses de recolección de la macroalga, se debe tomar en consideración un mejor control del crecimiento de la misma y sus condiciones ambientales. Al no conocer el tiempo que la macroalga *Acanthophora spicifera* llevaba en el lugar de cosecha no se podrá conocer con certeza las condiciones en las cuales esta se ha desarrollado.
- Este proyecto sirve como antesala a las futuras investigaciones relacionadas al tema. Por lo cual se recomienda realizar un diseño de experimentos más exhaustivo en el cual se involucren otras variables dependientes que podrían afectar a la concentración de los flavonoides en la macroalga en un intervalo de tiempo más prolongado. En el cual se consideren los efectos ambientales, tales como temperatura, pH, precipitación del agua, salinidad, entre otros.

- Debido a la biodisponibilidad que presenta la macroalga *Acanthophora spicifera* se recomiendan que se realicen más estudios acerca de los compuestos bioactivos presentes en ellas. Además, para conocer de forma más certera los rendimientos en la extracción de flavonoides de la macroalga, se recomienda llevar los métodos de extracción de escala laboratorio a un escalado piloto, con el fin de determinar los rendimientos verdaderos a una escala macro.
- Ya establecido el método de cuantificación en el equipo HPLC se puede proponer la implementación de un proceso a escala piloto para la extracción de compuestos flavonoides de la macroalga. De esta forma se facilitará conocer la concentración de flavonoides con el método analítico ya establecido.

BIBLIOGRAFÍA

- Abirami, R. G., & Kowsalya, S. (2016). Quantification and Correlation Study on Derived Phenols and Antioxidant Activity of Seaweeds from Gulf of Mannar. *Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10496475.2016.1240132*, 23(1), 9–17. <https://doi.org/10.1080/10496475.2016.1240132>
- Abraham, M. H., & Acree, W. E. (2014). On the solubility of quercetin. *Journal of Molecular Liquids*, 197, 157–159. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2014.05.006>
- Anand, J., Sathuvan, M., Babu, G. V., Sakthivel, M., Palani, P., & Nagaraj, S. (2018). Bioactive potential and composition analysis of sulfated polysaccharide from *Acanthophora spicifera* (Vahl) Borgeson. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 1238–1244. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.057>
- Ávila, E., Méndez-Trejo, M. del C., Riosmena-Rodríguez, R., López-Vivas, J. M., & Senties, A. (2012). Epibiotic traits of the invasive red seaweed *Acanthophora spicifera* in La Paz Bay, South Baja California (Eastern Pacific). *Marine Ecology*, 33(4), 470–480. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2012.00511.x>
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Bioactive components from leaf vegetable products. *Studies in Natural Products Chemistry*, 41, 321–346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5>

- Bermudez Serra, I. M. (2012). *Efecto de diversos parametros del proceso de sonicacion seguido de un almacenamiento en alta presión osmótica, sobre la Reducción de Salmonella Typhimurium y Lactobacillus rhamnosus en soluciones modelo y su aplicación en jugos de frutas*. [Universidad de Costa Rica]. <https://www.studocu.com/pe/document/universidad-nacional-de-ingenieria/quimica/34692/31225088>
- Bhadange, Y. A., Saharan, V. K., Sonawane, S. H., & Boczkaj, G. (2022). Intensification of catechin extraction from the bark of *Syzygium cumini* using ultrasonication: Optimization, characterization, degradation analysis and kinetic studies. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 181, 109147. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2022.109147>
- Cai, Y., Yu, Y., Duan, G., & Li, Y. (2011). Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872–1877. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.02.026>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215009001>
- Carvajal, R., & Santillán, X. (2019). *Plan de Acción Nacional para la Conservación de los Manglares del Ecuador Continental*.
- ECOLAP, & MAE. (2007). *Guía del Patrimonio de Áreas Naturales Protegidas del Ecuador* (1ra. Edición).

- el Shoubaky, G. A., Abdel-Daim, M. M., Mansour, M. H., & Salem, E. A. (2016). Isolation and Identification of a Flavone Apigenin from Marine Red Alga *Acanthophora spicifera* with Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities. *Journal of Experimental Neuroscience*, *10*(1), 21–29. <https://doi.org/10.4137/JEN.S25096>
- García de Marina Bayo, A., & Yusá Marco, D. J. (2016). *HPLC instrumental*. Editorial Universitat Politècnica de València.
- 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>
- Jørgensen, P. M., León-Yáñez, Susana., & Missouri Botanical Garden. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador = Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador*. 1181. https://books.google.com/books/about/Catalogue_of_the_Vascular_Plants_of_Ecua.html?hl=es&id=uRklAQAAAJ
- Lewis, J. (2008). *Acanthophora spicifera*. *CABI Compendium*, *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/CABICOMPENDIUM.107763>
- Lopez Gil, A. M. (2013). *Metodología para la Determinación de Epigallocatequina Galato en Té Verde por UPLC-PDA* [Universidad ICESI]. https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/76827/1/metodologia_epigallocatequina_galato.pdf

- Luna-Guevara, M. L., Luna-Guevara, J. J., Hernández-Carranza, P., Ruíz-Espinosa, H., & Ochoa-Velasco, C. E. (2018). Phenolic Compounds: A Good Choice Against Chronic Degenerative Diseases. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59, 79–108. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00003-7>
- MAATE. (2019). *Segundo Resumen de Información del Abordaje y Respeto de Salvaguardas para REDD+ en Ecuador*. http://reddecuador.ambiente.gob.ec/redd/?page_id=909
- MAATE. (2020). *Programa REDD+ Early Movers Ecuador*. <https://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2020/08/TDR-UN-UNA-INVESTIGADOR-A-DE-ANALISIS-QUIMICO.pdf>
- MAATE, MAG, & PNUD. (2021). *Mesa de Trabajo REDD+. Cuadernos de participación experiencias de la plataforma nacional de diálogo y participación de la Sociedad Civil, comunidades, pueblos y nacionalidades indígenas en la fase de preparación e implementación del enfoque REDD+ en el Ecuador. Cuaderno 1 De donde partimos, Contexto ecuatoriano para la participación y enfoque del proceso. Programa Integral Amazónico de Conservación de Bosques y Producción Sostenible (PROAmazonía)*. <https://www.proamazonia.org/wp-content/uploads/2021/12/REDD-MAS-07dic-PROAmazonia.pdf>
- Marinho, G. S., Sørensen, A.-D. M., Safafar, H., Pedersen, A. H., & Holdt, S. L. (2019). Antioxidant content and activity of the seaweed *Saccharina latissima*: a seasonal perspective. *Journal of Applied Phycology*, 31(2), 1343–1354. [https://doi.org/10.1007/s10811-018-1650-](https://doi.org/10.1007/s10811-018-1650-8)

- Mendoza Wilson, A. M. (2006). *Estudio Computacional del mecanismo antioxidante de los flavonoides quercetina, (+)-catequina y cianidina, basado en su secuencia de desprotonacion*. [Centro de Investigacion en Materiales Avanzados, S.C].
<https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/553/1/034%20MENDOZA%20WILSON%20ANA%20MARIA%201.pdf>
- Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Putaux, J.-L., Cheynier, V., & Vernhet, A. (2003). Flavan-3-ol Aggregation in Model Ethanolic Solutions: Incidence of Polyphenol Structure, Concentration, Ethanol Content, and Ionic Strength. *Langmuir*, *19*(25), 10563–10572.
<https://doi.org/10.1021/la034927z>
- Prieto, G., & Aguilera, E. (2016). Métodos sostenibles para la síntesis de flavonas. *Investigación Joven*, *3*(1). <https://revistas.unlp.edu.ar/InvJov/article/view/2763>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, *27*(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Razmara, R. S., Daneshfar, A., & Sahraei, R. (2010). Solubility of Quercetin in Water + Methanol and Water + Ethanol from (292.8 to 333.8) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, *55*(9), 3934–3936. <https://doi.org/10.1021/JE9010757>
- Roleira, F. M. F., Varela, C. L., Costa, S. C., & Tavares-da-Silva, E. J. (2018a). Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, *57*, 115–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1>

- Roleira, F. M. F., Varela, C. L., Costa, S. C., & Tavares-da-Silva, E. J. (2018b). Phenolic Derivatives From Medicinal Herbs and Plant Extracts: Anticancer Effects and Synthetic Approaches to Modulate Biological Activity. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 115–156. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64057-4.00004-1>
- Schmid, M., Guihéneuf, F., & Stengel, D. B. (2017). Ecological and commercial implications of temporal and spatial variability in the composition of pigments and fatty acids in five Irish macroalgae. *Marine Biology*, 164(8), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S00227-017-3188-8/FIGURES/11>
- Stengel, D. B., & Dring, M. J. (2019). Seasonal variation in the pigment content and photosynthesis of different thallus regions of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta) in relation to position in the canopy. *https://Doi.Org/10.2216/I0031-8884-37-4-259.1*, 37(4), 259–268. <https://doi.org/10.2216/I0031-8884-37-4-259.1>
- Turton, R., Baillie, R. C., Whiting, W. B., & Shaeiwitz, J. A. (2008). *Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes* (3th ed.). Pearson Education.
- Valdez N., A. (2022). *Determinación de las Condiciones Óptimas de Extracción de Compuestos Antioxidantes y Fitohormonas de la Macroalga Acanthophora Spicifera de la Península de Santa Elena*. ESPOL.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1216, Issue 43, pp. 7143–7172). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>
- Waters. (2010). *2998 Photodiode Array Detector Operator's Guide*. www.waters.com.

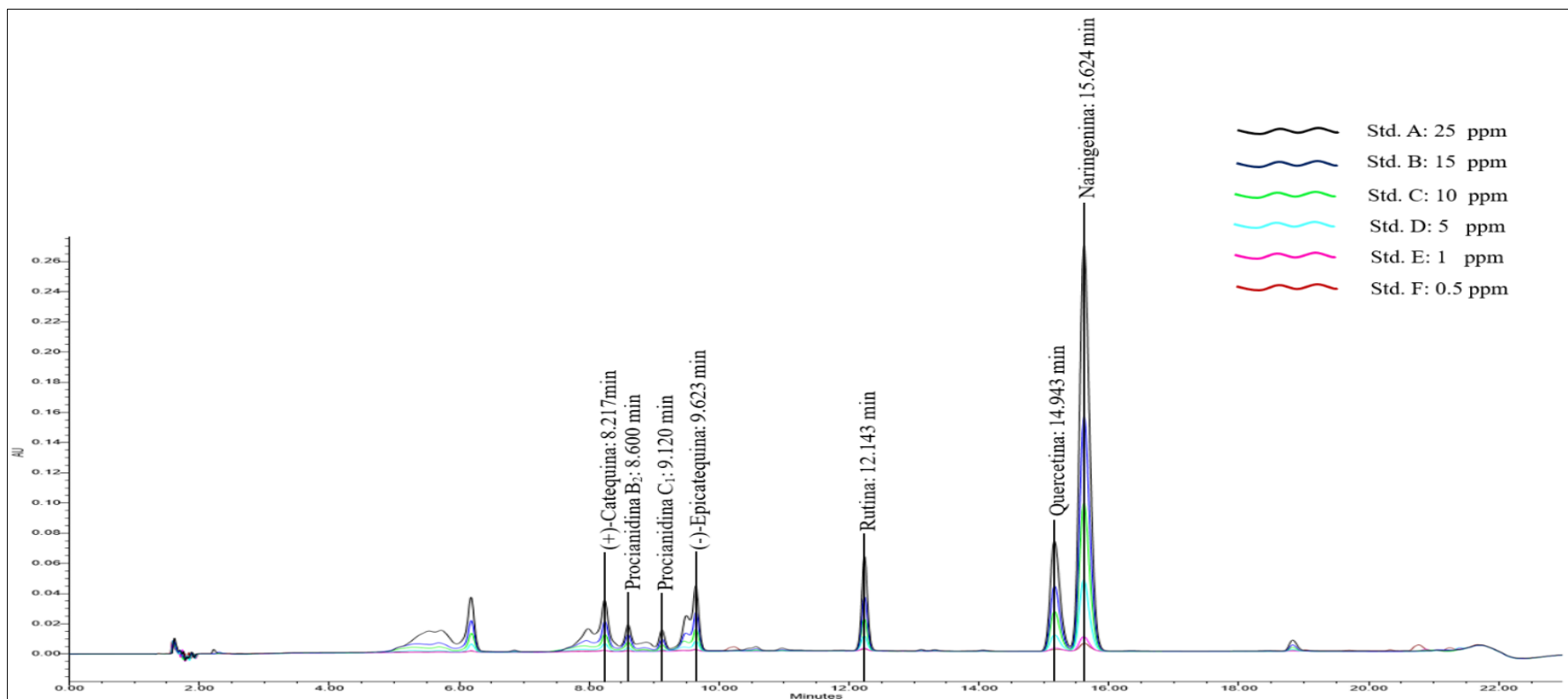
Yépez, V. (2010, July 29). *Ecuador: en defensa del manglar | Movimiento Mundial por los Bosques Tropicales*. Comunicaciones C-CONDEM. <https://www.wrm.org.uy/es/articulos-del-boletin/ecuador-en-defensa-del-manglar>

Zeng, L. M., Wang, C. J., Su, J. Y., Li, D., Owen, N. L., Lu, Y., Lu, N., & Zheng, Q. T. (2001). Flavonoids from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Chinese Journal of Chemistry*, 19(11), 1097–1100. <https://doi.org/10.1002/CJOC.20010191116>

ANEXOS

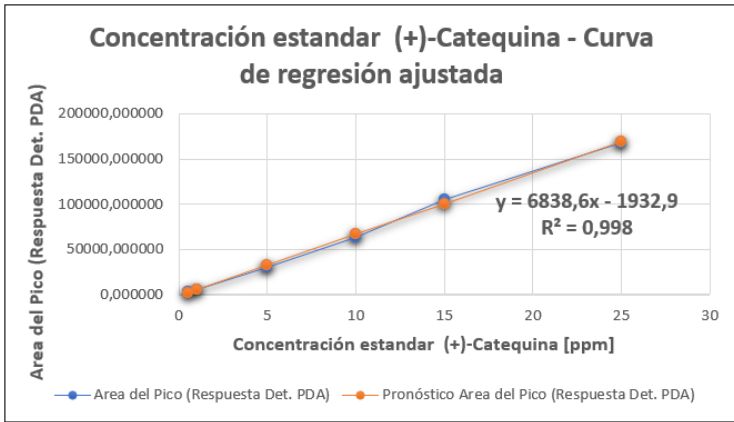
Anexo 1

Cromatograma de los estándares de referencia utilizados



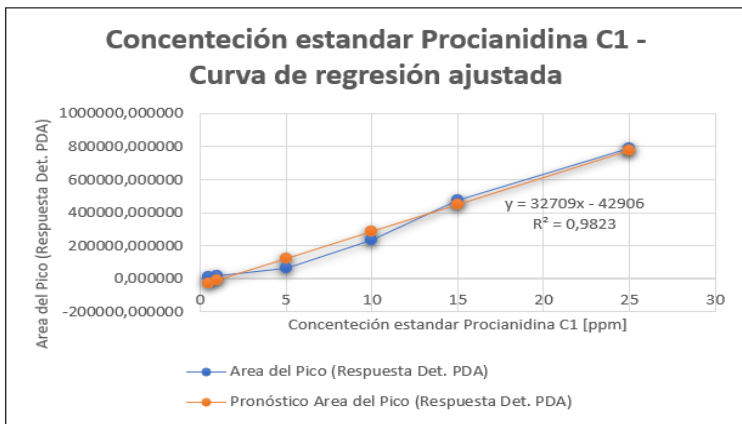
Anexo 2.

Curvas de calibración y análisis de linealidad.



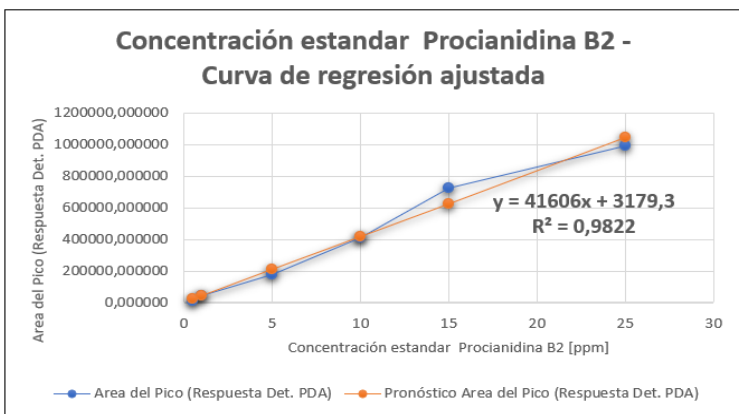
ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Catequina

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	2021,112175	1,46399E-06
Residuos		
Total		



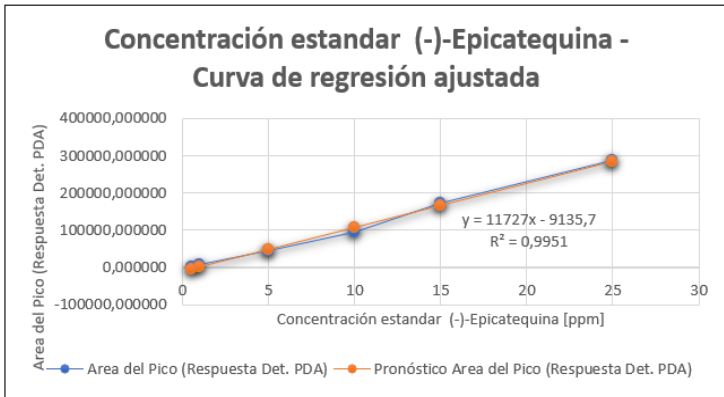
ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Procianidina C1

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	220,2770027	0,00012
Residuos		
Total		



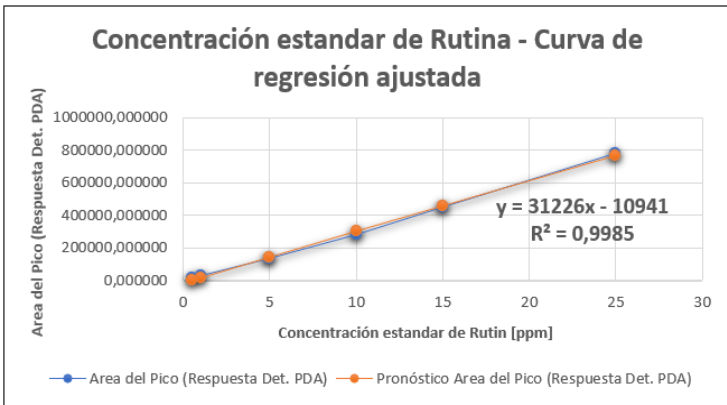
ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Procianidina B2

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	222,472693	0,00011768
Residuos		
Total		



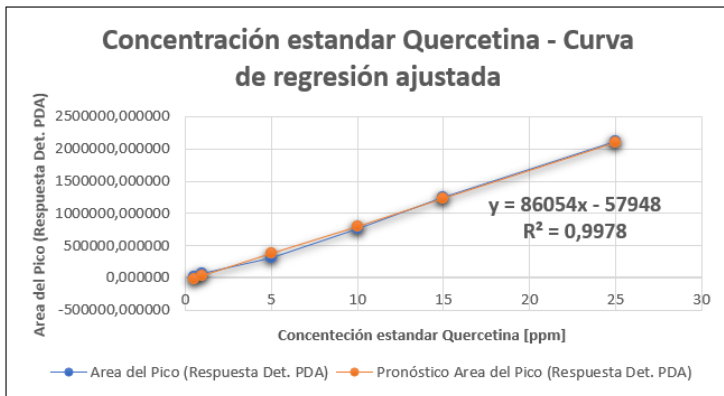
ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Epicatequina

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	805,2978318	9,17596E-06
Residuos		
Total		



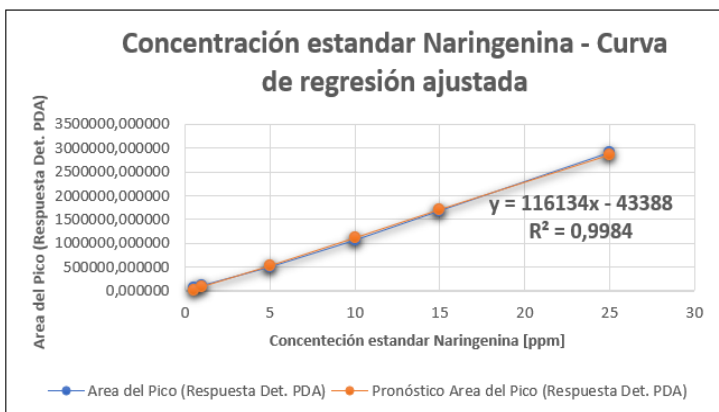
ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Rutina

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	2735,130586	8,00087E-07
Residuos		
Total		



ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Quercetina

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1776,446226	1,89417E-06
Residuos		
Total		



ANÁLISIS DE VARIANZA: Estándar de Naringenina

	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	2575,799326	9,0199E-07
Residuos		
Total		

Anexo 3.

Análisis de varianza ANOVA para la concentración de flavonoides para las extracciones realizadas a la muestra de macroalga recolectada en el mes de Septiembre

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Dige. Agua	3	92,06	30,68666667	0,5284213
Dige. Etanol 80%	3	50,247	16,749	0,355264
Sonic. Etanol 80%	3	26,091	8,697	0,117457

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	742,638696	2	371,3193481	1112,6869	E-08	5,14325285
Dentro de los grupos	2,00228466	6	0,333714111		1,9442	
Total	744,640980	8				

Anexo 4.

Análisis de varianza ANOVA para la concentración de flavonoides para las extracciones realizadas a la muestra de macroalga recolectada en el mes de Septiembre

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
1A	3	79,769	26,58966667	1,6234493
3A	3	28,08	9,36	0,123996
4A	3	27,051	9,017	0,455364

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	605,77767	2	302,888838	412,50347	E-07	5,14325285
Dentro de los grupos	4,4056186	6	0,73426978		3,7639	
Total	610,18329	8				

Anexo 5.

Análisis de prueba de medias pareadas o prueba T-test de muestras dependientes para la concentración de flavonoides presentes en la macroalga Acanthophora recolectada en septiembre y enero.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas:
Época de recolección del alga

	<i>IAS-Ri</i>	<i>IAH-Ri</i>
Media	30,6866667	26,5896667
Varianza	0,52842133	1,62344933
Observaciones	3	3
Coefficiente de correlación de Pearson	0,59553799	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	2	
Estadístico t	6,92953784	
P(T<=t) una cola	0,01009828	
Valor crítico de t (una cola)	2,91998558	
P(T<=t) dos colas	0,02019656	
Valor crítico de t (dos colas)	4,30265273	

Anexo 6.

Protocolo de extracción y cuantificación de flavonoides mediante HPLC

PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES MEDIANTE HPLC

1. OBJETIVO

Este procedimiento tiene por objeto describir la metodología para la extracción y cuantificación de flavonoides presentes en la biomasa de macroalgas.

2. ALCANCE Y APLICACIÓN

Este método es aplicable para la determinación de flavonoides en biomasa de macroalgas.

3. ABREVIATURA

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

PDA: Photo diode Array

4. REFERENCIAS

4.1 Método de Referencia

Para la elaboración de este procedimiento se ha utilizado como referencia los siguientes documentos:

Normas ISO IEC 17025-2017

4.2 Documentos utilizados conjuntamente

Determinación de las Condiciones Óptimas de Extracción de Compuestos Antioxidantes y Fitohormonas de la Macroalga *Acanthophora Spicifera* de la Península de Santa Elena. ESPOL (Valdez N., 2022).

Ultrasound assisted extraction of selected edible macroalgae: Effect on antioxidant activity and quantitative assessment of polyphenols by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Algal Research*, 52 (Kumar et al., 2020).

Study on infrared-assisted extraction coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) for determination of catechin, epicatechin, and procyanidin B2 in grape seeds. *Food Chemistry*, 127(4), 1872–1877.(Cai et al., 2011).

5. GENERALIDADES

5.1 Definiciones

5.1.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular con estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos, y son por lo tanto estructuras polifenólicos. Se puede observar su

Anexo 7.

Cálculos para determinar el precio unitario de una botella de 1L de extracto.

- *Costo variable unitario*

$$CVu = \frac{CV}{Q}$$

CVu = costo variable unitario por litro de extracto (\$)

CV = costos variables por año (\$/año)

Q = volumen de extracto producido al año (L/año)

$$CVu = \frac{57967.42}{44885.02} = 1.29$$

$$CVu = \$ 1.29$$

- *Precio unitario*

$$Pv = \frac{CVu}{1 - MG}$$

Pv = precio de venta del extracto (\$)

CVu = costo variable unitario por litro de extracto (\$)

MG = margen de ganancia

$$Pv = \frac{1.29}{1 - 0.5} = 2.58$$

$$Pv = \$2.58$$

Anexo 8.

*Flujo de caja de los primeros 5 años del proceso para la producción de extractos de la macroalga *Acanthophora spicifera*.*

	Año 0	Año 1	Año 2	Año 3	Año 4	Año 5
Ingresos						
Ingresos por ventas						
Ventas de extractos		\$ 134,655.06	\$ 171,379.16	\$ 220,344.64	\$ 257,068.75	\$ 306,034.22
Cantidad		44885.02	57126.39	73448.21	85689.58	102011.41
Precio		\$ 3.00	\$ 3.00	\$ 3.00	\$ 3.00	\$ 3.00
Total ingresos por ventas		\$ 134,655.06	\$ 171,379.16	\$ 220,344.64	\$ 257,068.75	\$ 306,034.22
Ingresos financieros						
Inversion	\$ 125,000.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Total de ingresos financieros	\$ 122,000.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Total ingresos	\$ 122,000.00	\$ 134,655.06	\$ 171,379.16	\$ 220,344.64	\$ 257,068.75	\$ 306,034.22
Egresos						
Costos variables						
Energia		\$ 7,419.46	\$ 7,419.46	\$ 7,419.46	\$ 7,419.46	\$ 7,419.46
Agua		\$ 132.46	\$ 152.74	\$ 183.15	\$ 203.42	\$ 233.84
Materia prima		\$ 20,196.00	\$ 26,928.00	\$ 33,660.00	\$ 40,392.00	\$ 47,124.00
Compra de envases		\$ 30,219.50	\$ 38,172.00	\$ 49,305.50	\$ 57,258.00	\$ 68,391.50
Total costos variables		\$ 57,967.42	\$ 72,672.19	\$ 90,568.10	\$ 105,272.88	\$ 123,168.79
Costos fijos						
Salario de Operadores		\$ 44,100.00	\$ 44,100.00	\$ 44,100.00	\$ 44,100.00	\$ 44,100.00
Salario de Ingenieros		\$ 28,800.00	\$ 28,800.00	\$ 28,800.00	\$ 28,800.00	\$ 28,800.00
Mantenimiento		\$ 5,000.00	\$ 5,000.00	\$ 5,000.00	\$ 5,000.00	\$ 5,000.00
Total costos fijos		\$ 77,900.00	\$ 77,900.00	\$ 77,900.00	\$ 77,900.00	\$ 77,900.00
Gastos de constitución						
Compra de equipos	\$69,180	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Instalacion	\$51,885.00					
Total gastos de constitución	\$ 121,065.00	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -	\$ -
Total egresos	\$ 121,065.00	\$ 135,867.42	\$ 150,572.19	\$ 168,468.10	\$ 183,172.88	\$ 201,068.79
Saldo neto	\$ 935.00	\$ -1,212.36	\$ 20,806.97	\$ 51,876.53	\$ 73,895.87	\$ 104,965.43
Saldo acumulado	\$ 935.00	\$ -277.36	\$ 20,529.61	\$ 72,406.15	\$ 146,302.01	\$ 251,267.44