

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción**

Desarrollo de un Bioproducto sólido a partir de *Acanthophora spicifera* como bioestimulante para su potencial aplicación en el sector agrícola

ING-2607

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

Presentado por:

Mota Guaman Sofía América

Urrucsaca Guaman Jesús Alfonso

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

## Dedicatoria

---

Principalmente a Dios por brindarme sabiduría y fortaleza a lo largo de estos 4 años.

A mis padres, **Wilson y Carmen**, quienes con su amor, sacrificio y apoyo incondicional me han guiado en esta aventura. A mis hermanas:

**Joselyn, Denisse y Valeska**, por ser mi fuente de motivación y alegría. A mis abuelos,

**Dolores, Luis y Zenaida**, y a toda la Familia

**Urrucsaca Guamán** por todo su apoyo

incondicional, espero les sirva de ejemplo de

que todo se puede lograr. A mi compañera de

tesis y amiga Sofía, por su ayuda y soporte en

este duro proyecto.

Finalmente, dedico este proyecto a todas

aquellas personas que, de alguna manera, han

dejado huella en mi vida académica y

personal.

**Jesús Urrucsaca Guamán**

## Dedicatoria

---

Quiero dedicar este trabajo primeramente a Dios que me ha dado la vida y ha sido mi fuente de sabiduría y fortaleza para alcanzar todas mis metas. A mis padres Byron y Sofía por ser mis guías, mi inspiración y apoyo. A mi hermano Samuel, por ser mi compañero incondicional. A mis abuelos Sofía, Servio y América por llenarme de su sabiduría y fortaleza. A mis tías Vanessa y Rosa por enseñarme que todo llega a su tiempo.

A mi compañero de tesis y amigo Jesús por su apoyo constante, paciencia y dedicación durante este arduo camino.

**Sofía América Mota Guamán**

## Agradecimientos

---

Agradezco principalmente a todas las personas que aportaron de forma directa e indirecta en este proyecto. Dra. Patricia Manzano, Dra. Yris González, Ing. Alexander Espinoza y Ing. Marcela Muzzio sin duda hoy este proyecto también es de ustedes. Sus consejos y experiencia han sido de vital importancia para el desarrollo de este trabajo.

Sin olvidar, a la Ing. Miriam y la compañera Liz, por su ayuda para todos los análisis realizados. Finalmente, a mi grupo universitario “Las Divinas”, Thalía, Stephanie, Mateo, José y Rogger, por hacer que estos 4 años de estudios sean los mejores y darme los más agradables recuerdos de mi vida estudiantil.

**Jesús Urrucsaca Guamán**

## Agradecimientos

---

Mi más sincero agradecimiento a mi tutora, la Dra. Patricia Manzano y profesora Dra. Yris González, sus conocimientos y consejos para llevar adelante este proyecto fueron valiosos en todo momento.

Al Ing. Alexander Espinoza y la Ing. Marcela Muzzio, sin su apoyo y guía no hubiera sido posible concluir este proyecto. A la Msc. Miriam Ramos, Liz, Elías y José por contribuir enormemente con los resultados de este trabajo.

A mis amigos Alexander, Ivonne, Bryan, Steven, Orlando y Jhon, por su apoyo incondicional durante cada etapa de este proyecto. Su amistad ha sido parte esencial para llegar al final de este viaje.

**Sofía América Mota Guamán**

## Declaración Expresa

---

Nosotros **MOTA GUAMAN SOFIA AMERICA** y **URRUCSACA GUAMAN JESUS ALFONSO** acordamos y reconocemos que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí/nosotros durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me/nos corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi/nuestra innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al/los autor/es que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, viernes 30 de mayo del 2024.



Sofía Mota Guamán



Jesús Urrucsaca Guamán

# **Evaluadores**

---

**MSc. María Ordóñez Pazmiño**

Profesor de Materia

---

**Patricia Manzano Santana, PhD.**

Tutor de proyecto

## Resumen

El desarrollo de bioproductos a base de algas ha surgido en la industria agrícola como una alternativa sostenible para reducir el uso de productos químicos en los cultivos, ya que promueven el crecimiento de las plantas y mejoran su resistencia a enfermedades. Los bioestimulantes líquidos presentan una alta degradabilidad y altos costos de transporte, almacenamiento y energía para su conservación. Este estudio presenta el desarrollo un bioestimulante microencapsulado sólido evaluando la presencia de los compuestos bioactivos y sus propiedades fisicoquímicas según los agentes encapsulantes empleados. Se determinó que la mezcla de encapsulantes en proporción 8:2 y concentración del 25% en extracto retuvo 7121 mg/kg e.s. de polifenoles totales; y, 16.40 mg/kg e.s. de fitohormonas, mejoró la actividad antioxidante además de lograr porcentajes de humedad y solubilidad del 3.5% y 22.3%. Finalmente, el proceso simulado a escala piloto confirmó su rentabilidad con un valor actual neto de 399,000\$, una tasa interna de retorno del 18% y un tiempo de retorno de 5.5 años, por lo que se concluye que aplicar técnicas de microencapsulación a un bioproducto preserva componentes bioactivos, alarga la vida útil bajo condiciones ambientales de almacenamiento y es rentable. Por otra parte, el proyecto abre una brecha a futuras investigaciones que induzcan a la mejora de la propuesta de diseño puesta en marcha.

**Palabras Clave:** *Acanthophora spicifera*, fitohormonas, polifenoles, microencapsulado y liofilización



### *Abstract*

The development of algae-based bioproducts has emerged in the agricultural industry as a sustainable alternative to reduce the use of chemicals in crops, since they promote plant growth and improve their resistance to diseases. Liquid biostimulants have a high degradability and high transportation, storage, and energy costs for their conservation. This study presents the development of a solid microencapsulated bioproduct evaluating the presence of bioactive compounds and physicochemical properties according to the encapsulating agents. It was determined that sample four with a mixture of encapsulants in 8:2 ratio and a 25% concentration in extract retained 121 mg/kg e.s. of total polyphenols, 16.40 mg/kg e.s. of phytohormones, improving the antioxidant activity in addition to achieving humidity and solubility percentages of 3.5% and 22.3%. Finally, the pilot-scale simulated process confirmed its profitability with a net present value of \$399,000, an internal rate of return of 18% and a payback time of 5.5 years. Thus, it is concluded that applying microencapsulation techniques to a bioproduct preserves bioactive components and extends shelf life under environmental storage conditions. On the other hand, the project opens a path for future research that leads to the improvement of the design proposal implemented.

Keywords: *Acanthophora spicifera*, phytohormones, polyphenols, microencapsulation, and freeze-drying

# ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
1.1    INTRODUCCIÓN.....	2
1.2    DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	2
1.3    JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	4
1.4    OBJETIVOS.....	5
1.4.1    Objetivo general .....	5
1.4.2    Objetivos específicos .....	6
1.5    MARCO TEÓRICO .....	6
1.5.1 <i>Acanthophora spicifera</i> .....	6
1.5.2    Bioestimulante .....	8
1.5.3    Técnicas de secado.....	9
1.5.4    Microencapsulación .....	10
1.5.5    Diseño de experimentos:.....	13
1.5.6    Simulador de Bioprocesos .....	13
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>14</b>
<b>2.    METODOLOGÍA</b> .....	<b>15</b>
2.1    ESQUEMA DE PROCESOS .....	17
2.2    OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE <i>ACANTHOPHORA SPICIFERA</i> .....	18
2.2.1    Recolección del Alga <i>Acanthophora spicifera</i> .....	18
2.2.2    Pretratamiento del alga .....	19
2.2.3    Secado .....	19
2.2.4    Extracción.....	20
2.3    DISEÑO EXPERIMENTAL .....	21
2.3.1    Factorial 3k.....	21
2.3.2    Microencapsulación .....	21
2.3.3    Liofilizado .....	22
2.4    TÉCNICAS DE ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS.....	23
2.4.1    Humedad.....	23
2.4.2    Solubilidad en agua .....	24
2.5    TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN DE COMPONENTE BIOACTIVOS .....	24

2.5.1	<i>Cuantificación de componentes bioactivos por HPLC</i> .....	24
2.5.2	<i>Cuantificación de componentes bioactivos por espectrofotometría</i> .....	26
2.6	SIMULACIÓN .....	26
2.6.1	<i>Registro de componentes</i> .....	26
2.6.2	<i>Suposiciones</i> .....	27
2.6.3	<i>Validación de la simulación</i> .....	28
2.6.4	<i>Criterios de Rentabilidad</i> .....	29
<b>CAPÍTULO 3</b> .....		<b>30</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y ANÁLISIS</b> .....	<b>31</b>
3.1	OBTENCIÓN DE BIOESTIMULANTE LÍQUIDO .....	31
3.1.1	<i>Secado</i> .....	32
3.1.2	<i>Extracción sólido-líquida</i> .....	33
3.2	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	34
3.2.1	<i>Rendimiento de Encapsulado</i> .....	35
3.2.2	<i>Análisis Físicoquímicos</i> .....	37
3.2.3	<i>Cuantificación de componentes bioactivos</i> .....	38
3.2.4	<i>Estudio de Correlación</i> .....	41
3.3	SIMULACIÓN .....	42
3.3.1	<i>Simulación de escala piloto</i> .....	42
3.3.2	<i>Simulación de escala industrial</i> .....	45
3.3.3	<i>Proyección tecnoeconómico; Escala Industrial</i> .....	47
<b>CAPÍTULO 4</b> .....		<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>51</b>
4.1.1	<i>CONCLUSIONES</i> .....	51
4.1.2	<i>RECOMENDACIONES</i> .....	52
<b>5 REFERENCIAS</b> .....		<b>53</b>
<b>APÉNDICES A: SIMULACIÓN EN RSTUDIO</b> .....		<b>58</b>
<b>APÉNDICES B: ESCALA PILOTO</b> .....		<b>59</b>
<b>APENDICE C: ESPECIFICACIONES DE EQUIPOS EN EL MERCADO</b> .....		<b>65</b>

## Índice de figuras

Figura 1 .....	10
Figura 2 .....	16
Figura 3 .....	17
Figura 4 .....	18
Figura 5 .....	19
Figura 6 .....	20
Figura 7 .....	38
Figura 8 .....	39
Figura 9 .....	41
Figura 10 .....	44
Figura 11 .....	45

## Índice de tablas

Tabla 1 .....	7
Tabla 2 .....	7
Tabla 3 .....	11
Tabla 4 .....	12
Tabla 5 .....	12
Tabla 6 .....	31
Tabla 7 .....	32
Tabla 8 .....	33
Tabla 9 .....	35
Tabla 10 .....	36
Tabla 11 .....	37
Tabla 12 .....	46
Tabla 13 .....	47
Tabla 14 .....	48
Tabla 15 .....	48

# Capítulo 1

## 1.1 Introducción

En el presente trabajo se explica la acción que ejerce un agente microencapsulante en el desarrollo de un producto bioestimulante liofilizado a partir de la macroalga *Acanthophora spicifera*. Este bioestimulante requiere no sólo preservar la estabilidad sus compuestos bioactivos como polifenoles, flavonoides y fitohormonas, sino también asegurar la calidad durante el almacenamiento. En colaboración con el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se busca abordar el control de la degradabilidad de estos componentes bioactivos mediante procesos de microencapsulación y liofilización. Además, de promover una práctica sostenible que beneficie a las comunidades que albergan el cultivo de la macroalga ofreciendo una alternativa rentable para su producción.

## 1.2 Descripción del Problema

En la última década, el sector agrícola ha experimentado una transformación significativa impulsada por la necesidad de cubrir la demanda alimentaria de la población sin comprometer la calidad de los productos (González, 2022). Este desafío ha provocado el uso excesivo de productos químicos de origen sintético que afecta negativamente la fertilidad del suelo, la biodiversidad y la salud humana (Food and Agriculture Organization of United Nations, 2023). Ante esta situación, surge la necesidad de desarrollar bioproductos de uso agrícola como una alternativa sostenible y amigable con el ambiente (Murillo et al., 2023; Parra, 2010).

Diversos estudios han comprobado la efectividad de bioproductos a base de extractos que actúan como bioestimulantes agrícolas, por citar ejemplos, la literatura reporta que esta actividad está presente en los extractos polifenólicos de *Picea abies*, semillas de uva y maíz; y en los extractos de macroalgas marinas como la *Allium nodosum* La (L.) (Jasso et al., 2023; Espinosa et al., 2020). Estos bioproductos ya sean líquidos o en polvo destacan por la capacidad de mejorar el crecimiento y la resistencia de las plantas.

Sin embargo, estos bioproductos enfrentan desafíos importantes como la degradación temprana de sus componentes bioactivos, con la consecuente degradación, lo cual reduce su efectividad y eleva los costos asociados con su almacenamiento y producción (Salazar et al., 2018).

En este sentido, los bioestimulantes a base de algas, dentro de su composición química incluyen la presencia de polifenoles, flavonoides y fitohormonas, estructuras que son particularmente vulnerables a la oxidación y a reacciones indeseables que comprometen la estabilidad y calidad del producto (Martínez et al., 2015).

Por otro lado, el alto contenido de humedad ( $\geq 80\%$ , p/p) presente en la macroalga, facilita el crecimiento de microorganismos lo cual contribuye a la en la descomposición del producto y la pérdida de sus propiedades funcionales (Martínez et al., 2015). Este alto contenido de agua también dificulta su manejo, almacenamiento y transporte, incrementando significativamente los costos asociados (Napiórkowska et al., 2023).

Actualmente, El Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se enfoca en el desarrollo de bioproductos con el objetivo de promover su aplicabilidad en los diferentes sectores de la industria del país<sup>1</sup>. En colaboración con el CIBE, Gavilanes y Titusunta 2023, desarrollaron en su tesis de pregrado, un bioestimulante líquido a partir del alga *Acanthophora spicifera*. Por lo expresado, y para garantizar la estabilidad del producto, el principal desafío radica en el diseño del formulado del bioestimulante líquido a un estado sólido para mejorar su estabilidad y rentabilidad.

---

<sup>1</sup> Página Web del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador, <http://www.cibe.espol.edu.ec/nosotros>

### 1.3 Justificación del Problema

La industria agrícola ha mostrado un creciente interés en alternativas sostenibles para reducir el uso de productos químicos en los cultivos (Tilman et al., 2011). El desarrollo de bioproductos ha surgido como la principal alternativa en numerosos estudios recientes (Calvo et al., 2014). Entre estos bioproductos, los extractos de compost y vermicompost se destacan como bioestimulantes eficaces, capaces de promover el crecimiento de las plantas y aumentar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, lo que subraya su potencial para fomentar prácticas agrícolas más sostenibles y eficientes (Madende & Hayes, 2020).

Los bioestimulantes ofrecen varias ventajas en comparación con los fertilizantes convencionales. Económicamente, son más rentables a largo plazo, ya que disminuyen la necesidad de aplicaciones frecuentes y reducen los riesgos de lixiviación y contaminación del agua (Guillen et al., 2019). Además, su impacto ambiental es considerablemente menor, pues no introducen sustancias tóxicas en el suelo ni en el ecosistema circundante debido a que está hecho comúnmente a base de extractos de plantas (Food and Agriculture Organization of United Nations, 2023). Como ejemplos de estos bioestimulantes se incluyen el quitosano, ácidos húmicos, micorrizas y bacterias como *Azospirillum* y *Bacillus*, los cuales mejoran el crecimiento y la resistencia de las plantas (Pichyangkura & Chadchawan, 2015).

Los derivados de algas marinas también son un ejemplo de bioestimulantes que destacan especialmente por su contenido en componentes bioactivos como compuestos fenólicos, fitohormonas y pigmentos fotosintéticos, que mejoran la resistencia de las plantas a enfermedades y estrés ambiental (Valdez et al., 2023). Los extractos de algas marinas (EAM) representan más del 33% del mercado global de bioestimulantes vegetales, debido a su amplia aceptación en la agricultura como insumos ecológicos, biodegradables y seguros (Jasso-Cantú et al., 2023). Evidencias científicas han demostrado que los EAM estimulan el crecimiento y la



morfología de las raíces, mejoran el rendimiento de los cultivos y la calidad nutricional del producto (Espinosa et al., 2020).

Sin embargo, a pesar de que en la industria ya existe la comercialización de bioestimulantes de origen orgánico, estos son líquidos. Este formato presenta ciertas desventajas como la demanda de mayores espacios de almacenamiento, altos costos de transporte para su comercialización, exceso de consumo energético durante su almacenamiento y distribución, entre otras (Min et al., 2011). En este sentido, se convierte en una necesidad el desarrollo de bioestimulantes sólidos.

Es así como las técnicas de secado, como la liofilización, se vuelve una etapa del proceso a estudiar ya que ha demostrado éxito en reducir la degradación y mejorar la estabilidad, permitiendo así mantener la eficacia del producto sin requerir condiciones de almacenamiento intensivas, eso no elimina que sigue el producto teniendo un tiempo de vida útil limitado (Laureanti et al., 2023). Por lo tanto, nos permite buscar técnicas complementarias que garanticen la extensión del tiempo de vida útil del Bioproducto, la microencapsulación es una gran opción (Parra, 2015).

En este sentido, los procesos como la microencapsulación mediante liofilización han mostrado éxito en el control de la degradación y mejora de la estabilidad de los bioestimulantes, permitiendo mantener su eficacia sin necesidad de estar expuestas a condiciones intensivas de almacenamiento (Ramírez et al., 2015).

## 1.4 **Objetivos**

### 1.4.1 **Objetivo general**

Desarrollar un bioproducto microencapsulado sólido a partir de *Acanthophora spicifera* mediante procesos de liofilización para su potencial aplicación como bioestimulante en el sector agrícola.

#### 1.4.2 *Objetivos específicos*

1. Determinar el rendimiento de agentes microencapsulantes en un proceso de liofilización a diferentes proporciones a través del diseño experimental factorial 3<sup>k</sup>.
2. Analizar las propiedades fisicoquímicas y bioactivas como humedad, color, contenido de polifenoles totales, fitohormonas y actividad antioxidante con respecto a la variación de encapsulantes mediante técnicas analíticas, espectroscópicas y cromatográficas
3. Incorporar las etapas de encapsulación y liofilización a la simulación del proceso de elaboración del bioestimulante sólido para el análisis tecnoeconómico del sistema propuesto.

### 1.5 **Marco teórico**

#### 1.5.1 *Acanthophora spicifera*

*Acanthophora spicifera*, que por lo general se encuentra en ecosistemas marinos tropicales, resalta por ser una especie invasora con presencia en el Océano Pacífico oriental. En Ecuador existen zonas costeras como Ballenita y Palmar de la provincia de Santa Elena en las que se encuentran a través de líneas de cultivo (Beltrán & Vega, 2022). Su crecimiento es favorable en diversos sustratos y en diversas condiciones de movimiento del agua, luz, salinidad y temperatura, lo que facilita su propagación.

Además, de en ecosistemas de manglares y en un amplio rango de salinidad (25-40 g/100 g de agua), aunque su producción sostenible de biomasa en estos ecosistemas aún no se ha estudiado (Da Silva, 2022). En la tabla 1 presenta las principales fitohormonas reportadas en la tesis de Gavilanes & Titusunta, 2023) en diferentes extractos de la macroalga *Acanthophora spicifera*. (Guillén, et al., 2022)

**Tabla 1**

*Principales fitohormonas encontradas en extracto de Acanthophora Spicifera (Gavilanes & Titusunta, 2023)*

<i>Origen Acanthophora spicifera</i>	Vietnamita (Guillén, et al.,2022)	Trinidad y Tobago (Ali et al., 2022)
<b>Fitohormonas</b>	<b>Concentración (<math>\mu g g^{-1}</math>)</b>	<b>Concentración (<math>\mu g g^{-1}</math>)</b>
<b>Auxinas</b>	-	23
<b>Citoquininas</b>	15.3	45
<b>Giberelinas</b>	15.7	33

En la tabla 2, se presenta diferentes compuestos de interés identificados y reportados en la bibliografía en la macroalga *Acanthophora spicifera*, uno de ellos son las fitohormonas y flavonoides con actividades antibacterianas, antitumorales, procoagulantes y antioxidantes. También se han encontrado compuestos fenólicos con actividades anti proliferativas y antioxidantes (Pereira et al., 2017).

**Tabla 2**

*Recopilación de los Componente Fenólicos que poseen las macroalgas Acanthophora spicifera.(Gavilanes & Titusunta, 2023)*

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad (mg)</b>	<b>Fuente</b>	<b>Referencias</b>
Acanthophorin B	44		
Acanthophorin A	5		
Quercetina	45	Mar del Sur de China	(Z(Zeng et al., 2001)
Catequina	50		
Ácido Gálico	0.02		
Ácido dihidroxilbenzoico	0.01	India	(Abirami & Kowsalya, 2017)

Ácido cafeico	0.02		
Ácido p-cumárico	0.02		
Catequina	0.249	Ecuador	(Beltrán & Vega, 2022)

#### 1.5.1.1 **Proceso de extracción**

Por lo general, los métodos de extracción tradicionales consisten en pulverizar e hidratar las algas repetidas veces, pasando por diferentes filtros hasta adquirir la textura y composición adecuada dependiendo de su uso final; estos métodos varían según se utilice biomasa seca o húmeda (Shukla et al., 2019). Un gran ejemplo es la extracción por digestión acuosa

En su trabajo de tesis Gavilanes y Titusunta 2023, llevaron a cabo el método de extracción por digestión para la obtención de un aditivo nutraceutico. Su trabajo resume una digestión de macroalga y agua en una proporción de 0.25:10, calentando la mezcla a 43°C durante 38 minutos con agitación constante. Posteriormente, se filtró para separar la fase sólida de la líquida (Gavilanes & Titusunta, 2023). Si embargo, también existen métodos más avanzados como la extracción asistida por ultrasonido (EAU) (González, 2022).

#### 1.5.2 **Bioestimulante**

Según González Jorge (2022), la definición de bioestimulantes hace referencia a aquellos materiales que en cantidades mínimas aportan al crecimiento de las plantas, a la absorción de nutrientes, tolerancia al estrés abiótico, eficiencia de nutrientes y calidad del cultivo (González, 2022). Sin embargo, es preciso recalcar que los bioestimulantes no son fertilizantes, ya que no proporcionan nutrientes directamente a las plantas, pero pueden facilitar la adquisición de nutrientes al apoyar los procesos metabólicos en el suelo y las plantas (Madende & Hayes, 2020).

### **1.5.2.1 Técnicas de cuantificación de compuestos bioactivos (composición de los bioestimulante)**

Cuantificar los componentes bioactivos como polifenoles, flavonoides, fitohormonas y su actividad antioxidante en un Bioproducto es crucial para asegurar su eficacia y calidad (Pereira et al., 2017). En primer lugar, medir los polifenoles permite evaluar su capacidad antioxidante y su contribución a la salud general de las plantas. Asimismo, la cuantificación de los flavonoides ayuda a determinar su papel en la defensa contra el estrés oxidativo y las enfermedades (Li et al., 2016). Además, cuantificar las fitohormonas es fundamental para verificar su influencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Por último, la actividad antioxidante permite medir la capacidad del bioestimulante para neutralizar radicales libres y proteger a las plantas del estrés oxidativo (Min et al., 2011).

### **1.5.3 Técnicas de secado**

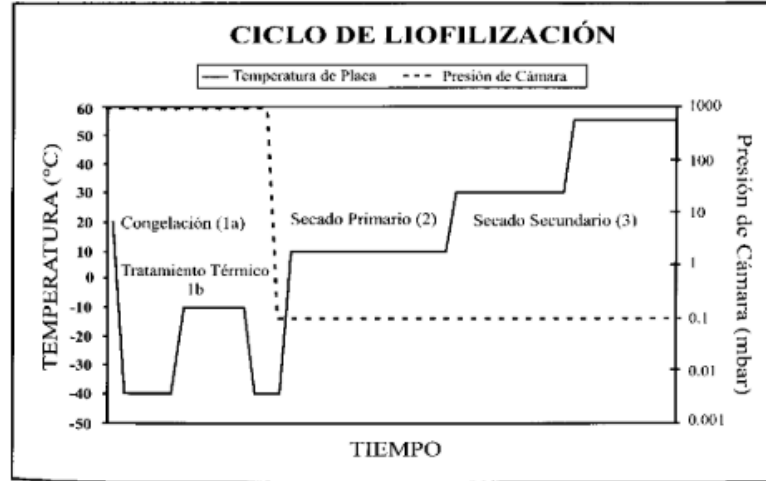
Las diferentes técnicas de secado se han convertido en una necesidad dada la importancia de obtención de bioproductos en fase sólida. Esta necesidad está sustentada en dos razones, la primera es incrementar la viabilidad de los microorganismos y la otra es reducir los costos de almacenaje y transportación, aspecto muy importante para su comercialización (Anias et al., 2015).

#### **1.5.3.1.1 Liofilización**

La liofilización es un proceso de secado mediante sublimación, desarrollado para minimizar la pérdida de compuestos que aportan sabor y aroma en los alimentos, pérdidas que son comunes en los métodos tradicionales de secado (Orrego, 2018). Este proceso tiene dos pasos principales: primero, se congela el producto y luego se seca por sublimación directa del hielo bajo presión al vacío (figura 1).

**Figura 1**

*Esquematzación de las etapas de liofilización con respecto a las variables de presión y temperatura. (Orrego, 2018)*



La liofilización permite proteger las sustancias oxidables y elimina entre el 95% y el 99,5% del agua, lo que garantiza una conservación prolongada (Hosseinizand et al., 2018). Por otra parte, este método minimiza la pérdida de sustancias químicas volátiles y de nutrientes y fragancias sensibles al calor. Además, previene cambios en las propiedades al inhibir el crecimiento microbiano y la actividad enzimática a bajas temperaturas (Roos, 2012). El transporte y almacenamiento a temperaturas normales son factibles y el producto se reconstituye rápidamente.

#### 1.5.4 *Microencapsulación*

La microencapsulación es la acción de recubrir o atrapar un material puro o una mezcla dentro de otro material para formar una cápsula, cuyo tamaño varía entre 5 y 300 micrones de diámetro (Napiórkowska et al., 2023b). El material por proteger, llamado núcleo, activo, fase interna o carga útil, puede ser un líquido, un sólido o un gas (Martínez et al., 2015).

##### 1.5.4.1 **Técnicas de la microencapsulación**

Por lo general, las técnicas de microencapsulación se utilizan con el objetivo de reducir la reactividad de los ingredientes activos con el ambiente, disminuir la tasa de transferencia del material encapsulado al exterior, facilitar el manejo del producto modificando sus características

físicas, enmascarar aromas o sabores indeseables, y controlar la liberación del ingrediente activo de manera temporal o específica (Martínez et al., 2015).

Entre las técnicas más comunes de microencapsulación se encuentran el secado por atomización, emulsificación, extrusión, liofilización y nanopartículas y nanocápsulas (Fang & Bhandari, 2017).

#### 1.5.4.2 Agentes encapsulantes

Los agentes encapsulantes utilizados en la microencapsulación desempeñan un papel fundamental en la protección y entrega controlada de ingredientes activos en la industria alimentaria (Fang & Bhandari, 2017). Entre estos agentes se encuentran, membranas de nylon, quitosano, alginato, maltodextrina, gomas, almidón y carbohidratos (Parra, 2015).

En la tabla 3 se resume la información en contrada sobre los diferentes tipos de encapsulantes.

**Tabla 3**

*Encapsulantes más comunes en el sector industrial y sus características (Parra, 2015)*

<b>Tipos de encapsulantes</b>	<b>Características principales</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>	<b>Aplicaciones Comunes</b>
Lípidos	Grasa láctea, lecitinas, ceras, aceites hidrogenados	Formación de películas uniformes, cubrimiento eficaz	Sensibles a la oxidación, limitada solubilidad	Encapsulación uniforme de ingredientes activos
Carbohidratos	Almidones, maltodextrinas, gomas	Ampliamente disponibles, versatilidad	Sensibles a la humedad, posible enmascaramiento	Soporte para encapsulación de ingredientes activos
Proteínas	Caseinato de sodio, proteína de lactosuero, gelatina	Buena emulsificación, solubilidad, biodegradabilidad	Posibles reacciones alérgicas, costosos	Microencapsulación de alimentos, formación de películas

Según Buljeta et al. (2022), los agentes detallados en la tabla 4 son los más utilizados para la encapsulación de polifenoles como flavonoides, en procesos de microencapsulación por liofilización.

**Tabla 4**

*Agentes encapsulantes, propiedades y costos (Ríos & Gil, 2021)*

<b>Agentes encapsulantes</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Costo</b>
Almidón modificado (AM)	Posee propiedades de biodegradabilidad. Aplicado para la microencapsulación de sabores.	3.25 \$/kg
Maltodextrina (MD)	Alta solubilidad, baja viscosidad, baja capacidad emulsionante.	3.29 \$/kg
Goma arábica (GA)	Muy buen emulsionante, alta solubilidad, baja viscosidad.	10.40 \$/kg

#### **1.5.4.2.1 Mezcla de Encapsulantes aplicadas**

El uso de mezclas de encapsulantes en diferentes proporciones puede ofrecer un buen balance entre costo y efectividad de microencapsulación. En la tabla 5 se resumen algunas de las investigaciones donde se emplea la mezcla de diferentes tipos de encapsulantes para la microencapsulación por liofilización y sus principales hallazgos.

**Tabla 5**

*Estudios de Encapsulantes Maltodextrina, Almidón y Goma Arábica a diferentes proporciones.*

<b>Proporciones microencapsulantes</b>	<b>Técnica de microencapsulación</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referencia</b>
MD:GA – 1:1 % (p/p) MD al 100%, AG al 100%	Liofilización	La maltodextrina al 100% preservó la mayor cantidad de polifenoles y flavonoides totales, y conservó el 73-86% de la actividad antioxidante presente en el extracto original.	(Ballesteros et al., 2017)
MD:GA – 1:1 (p/p)	Liofilización	La mezcla GA y MD exhibió un aumento en la eficiencia de encapsulación, de 93,28 % a 98,33 %.	(Laureanti et al., 2023)
MD al 100%	Liofilización.	Se logra conservar un 88% del contenido de polifenoles luego de un periodo de 200 días de almacenamiento.	(Ramírez et al., 2015)



*Nota: \* (MD: Maltodextrina. GA: Goma arábica)*

#### **1.5.5 *Diseño de experimentos:***

El diseño de experimentos es una metodología utilizada en la investigación para planificar, analizar e interpretar experimentos de manera controlada y sistemática. Su importancia radica en la capacidad de identificar y cuantificar las causas y efectos de las variables de interés, optimizando recursos y mejorando la validez de las conclusiones (Revelo & Jiménez, 2022). El método factorial  $3^K$  es especialmente relevante en un diseño de experimentos ya que permite estudiar el efecto simultáneo de K factores o variables de entrada del proceso, cada uno con dos niveles (alto y bajo), proporcionando una comprensión exhaustiva de las interacciones entre factores y ayudando a identificar combinaciones óptimas de variables para maximizar resultados deseados (A Fisher, 2011).

#### **1.5.6 *Simulador de Bioprocesos***

Los simuladores para bioprocesos son herramientas vitales en biotecnología ya que permiten modelar y optimizar procesos complejos de manera virtual, reduciendo costos y tiempo (Petrides et al., 1989). SuperPro Designer destaca en este campo, ofreciendo una plataforma integral para el diseño, análisis y optimización de procesos biotecnológicos. Su enfoque específico en bioprocesos y su integración de aspectos económicos y de sostenibilidad lo diferencian de otros simuladores, brindando una visión completa del proceso industrial (Hernández et al., 2021).

## **Capítulo 2**

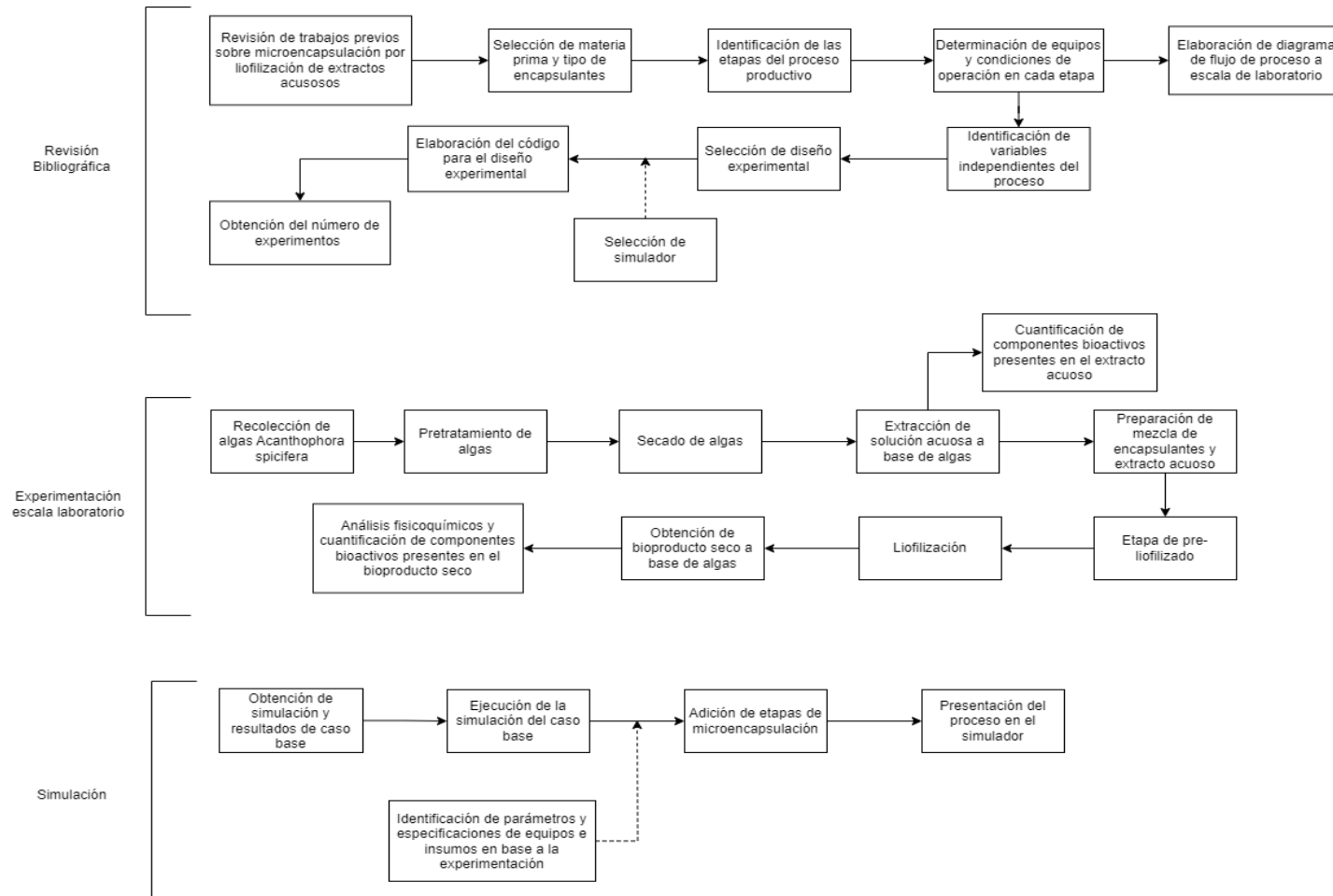
## 2. METODOLOGÍA

La metodología presentada en este capítulo está desarrollada con la finalidad de cumplir con los objetivos propuestos en el proyecto y se pueden dividir en 4 etapas:

- Obtención del extracto líquido de la macroalga *Acanthophora spicifera*
- Desarrollo del bioestimulante sólido a través del diseño de experimento factorial 3k para determinar el rendimiento de las diferentes proporciones de encapsulante
- Aplicación de técnicas analíticas e instrumentales para la determinación de propiedades fisicoquímicas y de cuantificación de componentes bioactivos
- Modificación e incorporación de las etapas de encapsulación y liofilizado de la simulación para la generar el análisis tecnoeconómico

**Figura 2**

Flujograma propuesto para diseño experimental y simulación del proceso productivo de bioproducto sólido a base de algas

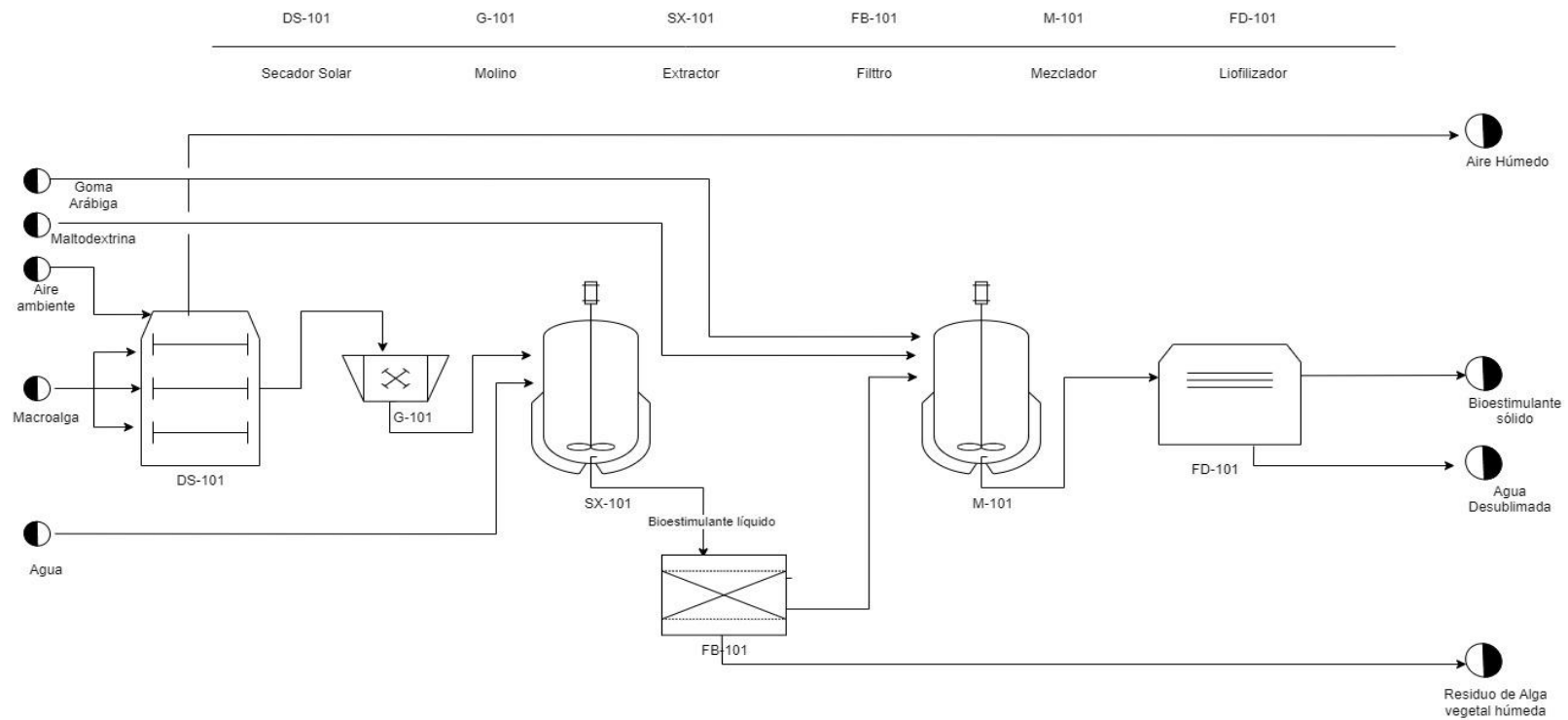


## 2.1 Esquema de procesos

En función de trabajos previos y mediante una revisión bibliográfica descrita en el capítulo 1, se desarrolló un diagrama de flujo de proceso (PFD) para el desarrollo del bioestimulante sólido a partir de la macroalga *Acanthophora spicifera*.

**Figura 3**

Diagrama de Flujo del proceso de elaboración del bioestimulante sólido



## 2.2 Obtención del extracto de *Acanthophora spicifera*

En esta sección se describe la primera etapa del proceso que fue la obtención del extracto de la macroalga y los procedimientos empleados seleccionados según experiencias anteriores del cliente y una minuciosa revisión bibliográfica.

### 2.2.1 Recolección del Alga *Acanthophora spicifera*

Esta etapa requiere de una preparación y estudio previo de la zona geográfica donde se recolectó la macroalga, la cual se llevó a cabo el día 7/06/2024 a las 10:00 am en la provincia de Santa Elena, playa ballenita (coordenadas: 2°12'24.6"S 80°52'51.8"W) y la supervisión de un nativo especialista. En la figura 4, se presenta el área superficial delimitada de Recolección de la macroalga *Acanthophora spicifera* (940 m<sup>2</sup>), y se consideró una distancia aproximada desde la orilla de 220 m. Durante la recolección se procuró que la toma sea de forma uniforme sobre el área previamente mencionada como recomendación de los expertos para no afectar la reproducibilidad de la especie en la zona.

#### Figura 4

Área de Recolección de la macroalga *Acanthophora spicifera*

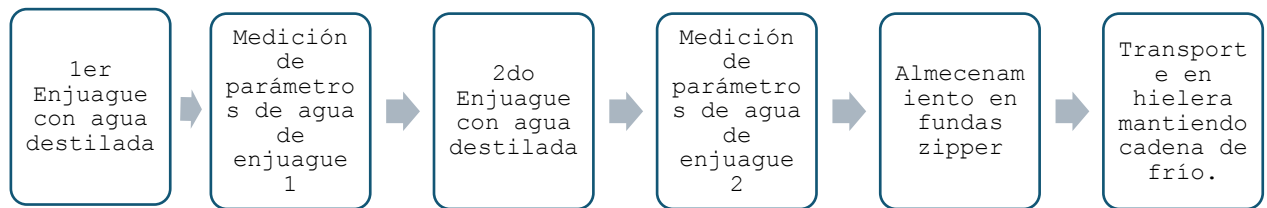


### 2.2.2 *Pretratamiento del alga*

En función de las experiencias anteriores que ha tenido el CIBE, se estableció como parte del protocolo hacer dos enjuagues (ver figura 5) In situ con agua destilada ya que el exceso de salinidad propia del medio de la macroalga y los diferentes residuos del mar durante el traslado puede llegar a alterar la calidad del extracto final (Mohee et al., 2015); y su posterior almacenamiento en medianas porciones de la macroalga ya lavada en fundas zipper dentro de una hielera con hielo y papel Kraft para su traslado y control de la cadena de frío que duró 2 horas aproximadamente.

#### **Figura 5**

Proceso de lavado y almacenamiento de la *Acanthophora spicifera*



### 2.2.3 *Secado*

La etapa de secado de la biomasa algal es representada por un alto costo operativo si no se utiliza energía solar como medio de calentamiento del aire para el secado (Tiwari, 2016). Por lo tanto, se decidió hacer uso del secado con energía solar este sistema no necesita de energía eléctrica para su funcionamiento, y los materiales para su construcción son de fácil acceso (Roche et al., 2016).

El tiempo total de secado fueron 4.5 días (aproximadamente 108 horas), se utilizó un secador de madera con 3 niveles de bandejas (ver figura 6) para disponer el material a secar. El alga se distribuyó en las 3 bandejas con un peso total aproximado de 3.8 kg de *Acanthophora spicifera*, además, el secador contaba con un techado para proteger a las algas de las condiciones

climáticas y de que recibiera la radiación solar de manera directa. En cada bandeja se puso el alga bajo una capa de gasa para favorecer el secado y evitar contaminación por contacto con la base de cada bandeja, de tipo malla de acero fino.

### Figura 6

*Sistema de secado aprovechando la energía solar.*



#### 2.2.4 Extracción

La extracción de la macroalga se hizo a través del método de digestión acuosa, replicando la proporción de 200g de alga por 14 L de agua que menciona Gavilanes y Titusunta, 2023 en su trabajo de titulación para la obtención de un bioestimulante líquido (Gavilanes & Titusunta, 2023). La temperatura promedio fue de 58°C durante aproximadamente 3 horas con agitación constante, debido a que temperatura superior podrían degradar el contenido bioactivo del alga (Jasso-Cantú et al., 2023). El proceso fue llevado a cabo en un DIGESTOR del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, ESPOL.

Luego el extracto obtenido fue sometido a una filtración casera para extraer el material sólido en exceso. Así se embotellaron al final alrededor de 10 L en botellas azuladas de 700 mL y guardadas en un congelador a -4°C, para ser utilizadas luego en el proceso de encapsulación y liofilización. Además, una muestra de este extracto también se usó para analizar contenido bioactivo: fitohormonas, flavonoides, polifenoles y antioxidantes.



## 2.3 **Diseño Experimental**

En este apartado se describe desde el tipo de diseño experimental, la determinación del número de experimentos, combinaciones necesarias, calidad del diseño y los procesos involucrados en esta etapa del proyecto.

### 2.3.1 **Factorial 3k**

Para el diseño experimental se utiliza el diseño factorial completo  $3^k$ , ampliamente empleado en experimentos que involucran un número pequeño de factores o variables independientes que afectan directamente al proceso (Bao, 2020). En este tipo de diseño, cada factor adopta tres niveles y una réplica completa de experimentos requiere realizar  $3^k$  combinaciones.

Se emplea RStudio para determinar el número necesario de experimentos mediante el diseño factorial completo  $3^k$ , así como también todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores y las interacciones. Para ello se emplea las funciones “expand. grid” y “model. matrix” que son parte del paquete base de RStudio.

### 2.3.2 **Microencapsulación**

#### 2.3.2.1 **Selección de factores y niveles**

Para el encapsulado necesitamos de agentes encapsulantes y tal como se describe en el marco teórico, se hizo una búsqueda bibliográfica de los más comunes para la retención de contenido bioactivo. Los seleccionados fueron maltodextrina y goma arábica ya que eran las que en investigaciones anteriores dieron mejores resultados.

Por otro lado, para definir las diferentes proporciones a trabajar para cada uno de los encapsulantes se tomó como referencia un estudio realizado por Ramírez et al., en el 2015 acerca de la estabilidad de compuestos polifenólicos en extractos de origen vegetal durante su liofilización. En este estudio se prueban concentraciones de encapsulante del 10, 20 y 30 %, donde se observaron que a medida que incrementaba la concentración también lo hacía el contenido polifenólico, sin embargo, este incremento se potenciaba de acuerdo con como variaba

las proporciones de los encapsulantes. Observándose que los mejores resultados fueron a mayor concentración y baja proporción, y menor concentración con alta proporción, es así como se plantearon las condiciones de experimentación para este proyecto descritas en la siguiente tabla.

**Tabla 6**

Selección de factores y niveles para el diseño experimental

<b>Factores</b>	<b>1: Concentración de encapsulante (%p/p)</b>	<b>2: Proporción encapsulante (MD: GA) * (%p/p)</b>
<b>Niveles</b>		
-1	15	8:2
0	25	1:1
1	35	2:8

*Nota: \* (MD: Maltodextrina. GA: Goma arábica)*

### 2.3.2.2 Encapsulado

La adición del encapsulante a la muestra de extracto se lo hace mediante calentamiento y agitación. La temperatura promedio fue de 35 a 45°C un rango que está dentro de las temperaturas de solubilidad tanto de la maltodextrina como de la goma arábica. El tiempo de operación oscila entre los 25 - 50 min, la condición de parada para la mezcla fue la presencia de solidos suspendidos, una vez que se observaba ya que no había solidos en suspensión de encapsulantes, se detenía el proceso.

Así se prepararon 50mL de cada muestra que fueron distribuidas en volúmenes de 10mL en tubos de plásticos FALCON y cubiertas en la parte superior con papel Parafilm para empezar el congelamiento como etapa previa a la liofilización.

### 2.3.3 Liofilizado

El proceso de liofilizado comienza con el congelamiento de las muestras. En función de las referencias citadas en el marco teórico la fase previa a la liofilización era el congelamiento por 48 horas a de -80°C (Orrego, 2008). Esta primera etapa es primordial ya que promoverá un largo o corto tiempo de secado para obtener un producto correctamente liofilizado, es decir

completamente seco. Además, los tubos FALCON deben congelarse de forma horizontal para favorecer posteriormente un liofilizado uniforme.

Es así como una vez cumplida la etapa de congelamiento, se proceden a liofilizar en el laboratorio de Ecotoxicología de la Facultad de Ciencias de la Vida, ESPOL. El liofilizador es de la marca “THERMO FISHER”, este equipo cuenta con condiciones de operación fijas -40°C y 300 mbar, las muestras son sometidas a un tiempo promedio de 4 días para lograr obtener muestras completamente liofilizadas.

#### 2.3.3.1 *Determinación del rendimiento de la encapsulación*

Acabado el proceso de liofilización, se procede a pesar cada muestra liofilizada para determinar el rendimiento del encapsulante mediante la ecuación (2.1) y luego se almacena en un recipiente completamente hermético la muestra y se mantiene al ambiente. Evitando ser expuesta a altas condiciones de humedad y afectar la calidad del producto. Así se obtienen las muestras listas para los procesos de análisis fisicoquímicos.

$$\%R = \frac{\text{Peso final de encapsulado}}{\text{peso de sólidos inicial} + \text{peso de encapsulantes}} \times 100 \quad (2.1)$$

## 2.4 **Técnicas de Análisis fisicoquímicos**

En esta sección se describen los protocolos para determinar humedad y la solubilidad en agua del bioproducto liofilizado.

### 2.4.1 *Humedad*

Para determinar la cantidad de humedad se emplea el método el método AOAC N° 934.06, (2000) para el cual se pesó previamente la muestra y se calentó en un horno a 100-105°C durante un 2-3 horas. Se empleó la ecuación 1 para el cálculo del contenido de humedad.

$$\%Humedad = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (2.2)$$

## 2.4.2 Solubilidad en agua

Para el cálculo de la solubilidad se emplea el método según (Ceballos, Giraldo & Orrego, 2012). Para ello se empleó 1 g de muestra que se dispersó en 100 mL de agua destilada (30 °C) y se agitó en una centrífuga a 3000 rpm por 5 min. Una alícuota de 25 mL del sobrenadante se secó al horno a 105 °C durante 5 h y se pesa. Se empleó la ecuación 2 para el cálculo del % de solubilidad.

$$\%S_{H_2O} = \frac{\text{Peso de los sólidos disueltos en el sobrenadante}}{\text{Peso de la muestra}} \times 100 \quad (2.3)$$

## 2.5 Técnicas de Cuantificación de componente bioactivos

Las técnicas descritas en esta sección se seleccionaron según los protocolos y procedimientos del Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador (CIBE).

### 2.5.1 Cuantificación de componentes bioactivos por HPLC

La cuantificación de fitohormonas y flavonoides se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) marca Waters el cual se encuentra disponible en el laboratorio de bioproductos y bioprocesos del CIBE.

#### 2.5.1.1 Preparación de muestras de extracto acuoso

Para la preparación de muestras de extracto acuoso se utilizó la técnica descrita por (Gavilanes & Titusunta, 2023). Para la preparación de las muestras se tomaron 1.5 mL de extracto usando una micropipeta y se introdujeron en cuatro tubos Eppendorf de 2 mL de capacidad, después se centrifugaron en una microcentrífuga marca Jouan a 7600 rpm por 5 minutos para la separación de partículas residuales presentes en el extracto acuoso. El sobrenadante se extrajo con filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm y se inyectó 1 mL de extracto en viales para HPCL marca Agilent. Así mismo se inyectó agua tipo HPLC junto con los viales para que actúe como un blanco.

#### 2.5.1.2 Preparación de muestras liofilizadas

La preparación de las muestras liofilizadas se realizó utilizando el procedimiento descrito por (Luca et al., 2014). Se pesaron 100 mg de microcápsulas y se añaden a 1 mL de una solución

de etanol, ácido acético y agua (50:8:42, v/v). Se agitó en un mezclador vórtice durante 1 minuto y luego se colocó en un ultrasonido (marca LABMAN )durante 20 minutos. Se coloca la mezcla en tubos Eppendorf de 2 mL y se centrifuga (marca JOUAN A14 ) a 4000 rpm por 5 minutos. Finalmente se filtra con filtros de jeringa de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### 2.5.1.3 **Cuantificación de fitohormonas**

La cuantificación de fitohormonas se realizó adaptando las condiciones de operación descritos por (Medina & Morales, 2022), las cuales se basan en protocolos establecidos por el CIBE. El personal técnico calificado del CIBE llevó a cabo el análisis utilizando un Arc HPLC marca Waters; equipado con un inyector automático, una bomba cuaternaria y una columna marca Agilent C18 (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ).

Las fases móviles que se utilizan para separar sustancias activas fueron acetonitrilo y ácido fórmico 0.1% en agua. El volumen de inyección la muestra fue de 10  $\mu\text{l}$ . Mientras que el caudal de inyección de la fase móvil fue de 1 mL/min a una temperatura de columna de 25°C (Medina & Morales, 2022).

#### 2.5.1.4 **Cuantificación de flavonoides**

La cuantificación de flavonoides se realizó adaptando las condiciones de operación descritos por (Romero & Cruz, 2023), las cuales se basan en protocolos establecidos por el CIBE. Se llevó a cabo el análisis utilizando un Arc HPLC marca Waters; equipado con un inyector automático, una bomba cuaternaria y una columna marca Agilent C18 (4,6 x 150 mm, tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ). Los datos se interpretaron utilizando el software Empower™ 3.

La fase móvil se usó para separar las sustancias activas: (A) metanol y (B) tampón dihidrógeno fosfato de potasio 5 mmol/l (20:80). Cuantificación de actividad antioxidante. El volumen de inyección de la muestra fue de 20  $\mu\text{l}$ . Mientras que el caudal de inyección de la fase móvil fue de 1 mL/min a una temperatura de columna de 38°C (Romero & Cruz, 2023).

## 2.5.2 *Cuantificación de componentes bioactivos por espectrofotometría*

### 2.5.2.1 **Cuantificación de Actividad antioxidante: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH)**

Para la cuantificación de actividad antioxidante se utilizó la técnica descrita por (Viteri et al., 2022), en la que se utiliza una solución de DPPH de 156  $\mu\text{M}$  en metanol. Las muestras se diluyeron con agua tipo I en proporciones de 1:0, 1:1 y 1:4. En una placa se inyectó en cada pocillo una mezcla de 50  $\mu\text{l}$  de muestra diluida con 150  $\mu\text{l}$  de solución DPPH (156  $\mu\text{M}$ ) con una micropipeta, en total se realizó el análisis de la muestra por cuadruplicado. Se dejó reposar las muestras a oscuridad por 30 minutos. Para el análisis se empleó un lector de microplacas marca Cytation<sup>TM</sup>5, BioTek para medir la absorbancia de las muestras a 517 nm. Se utilizó una curva de calibración con Trolox (97%).

### 2.5.2.2 **Cuantificación de polifenoles totales**

El contenido fenólico total se cuantificó según el método de Folin-Ciocalteu (FC) descrito por (Viteri et al., 2022). Se mezclaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra con 100  $\mu\text{l}$  de reactivo FC (1:10 v/v) y 80  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (7.5%), se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia de la solución azul resultante a 760 nm en un lector de microplacas marca Cytation<sup>TM</sup>5, BioTek. Se utilizó una curva de calibración con ácido gálico.

## 2.6 **Simulación**

### 2.6.1 *Registro de componentes*

El proceso descrito a lo largo del capítulo tiene componente como maltodextrina y goma arábica que no están definidos de manera oficial en la base de datos de “SuperPro Designer”. Por lo tanto, se hecho uso del software ASPEN PROPERTIES V.12, para determinar las propiedades termodinámicas y fisicoquímicas de la sustancia química de interés. Esto y la versatilidad del simulador nos permitirá registrar los componentes faltantes. En la tabla 7 se plantean las propiedades principales que el simulador requiere para el registro de cualquier componente.

**Tabla 7**

Parámetros requeridos para el registro de nuevos componentes en SuperPro Designer, (Zea, 2023).

<b>Propiedades</b>	<b>Especificación</b>
Peso Molecular	Valor en [g/gmol]
Punto normal de ebullición	Valor en [°C]
Temperatura crítica	Valor en [°C]
Presión crítica	Valor en [bar]
Factor de Comprensibilidad	Valor adimensional
Factor acéntrico	Valor adimensional
Densidad	$\rho \left[ \frac{g}{l} \right] = a + bT, T[K]$
Capacidad calorífica de líquido/sólido	$C_p \left[ \frac{J}{gmol - k} \right]$ $= a + bT + cT^2 + dT^3$ $+ eT^4, T[K]$
Capacidad calorífica de gases	$C_p \left[ \frac{J}{gmol - k} \right] =$ $a + bT + cT^2 + dT^3 + eT^4, T[K]$
Coeficientes de Antoine	$Log(P^{sat} [mmhg]) = A - \frac{B}{C + T[°C]}$

### 2.6.2 Suposiciones

Con la finalidad de cumplir con los grados de libertad y evitar la sobre especificación ya sea en equipos o procesos se plantean las siguientes suposiciones para efectos de la simulación del desarrollo del bioestimulante sólido (Zea, 2023).

**Tabla 8**

Suposiciones previas a la simulación

<b>Proceso</b>	<b>Suposición</b>
----------------	-------------------

Alimentación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Materia prima con humedad superior al 90%.</li> </ul> <p>(Mohee et al., 2013)</p>
Secado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El agua es el único compuesto volátil presente en la entrada.</li> <li>• Se utiliza aire en exceso con humedad, temperatura y velocidad constante.</li> <li>• No hay pérdida de materia por la potencia del aire.</li> </ul> <p>(Gavilanes &amp; Titusunta, 2023)</p>
Extracción	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No hay gradientes de temperatura y concentración en el mezclado.</li> <li>• No hay transferencia de energía con el ambiente.</li> </ul> <p>(Zea, 2023)</p>
Encapsulado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mezcla perfecta (agitación y temperatura constante)</li> <li>• No hay pérdida de componente volátiles durante el calentamiento.</li> </ul>
Liofilizado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Congelamiento uniforme</li> <li>• Presión de la bomba de vacío constante</li> </ul>

### 2.6.3 Validación de la simulación

En busca de verificar si el proceso simulado se ajusta con precisión al comportamiento del real del procedimiento que se está estudiando se procede con una etapa de validación. Un proceso de validación aumenta la confianza de los resultados de la simulación, genera confianza frente a ensayo predictivos y aumenta su aplicabilidad.

Es así como para este proyecto se han seleccionado dos variables de salida que servirán como variables de verificación que son la fitohormona kinetina y el flavonoide catequina. Se comparará las concentraciones (mg/ kg e.s.) en el producto final de la simulación con los resultados en el laboratorio a través de la siguiente formula.

$$\%E = \left| \frac{C_{Vsalida\ exp.} - C_{Vsalida\ sim.}}{C_{Vsalida\ exp.}} \right| \times 100 \quad (2.4)$$



## 2.6.4 Criterios de Rentabilidad

### 2.6.4.1 Valor actual neto.

Conocido por sus siglas VAN es valor final de ganancia neta que se va a tener como beneficio del proyecto, que indica si el proyecto es rentable (superior a cero) o no (inferior a cero). Además, es el criterio de rentabilidad de mayor peso (Lledó, 2022).

$$VAN = \frac{BN_1}{(1+i)^1} + \frac{BN_2}{(1+i)^2} + \dots + \frac{BN_n}{(1+i)^n} - I$$

BNn = Beneficio neto del periodo n (2.5)

I = Inversión inicial

i = Tasa de descuento

### 2.6.4.2 Tasa interna de Retorno.

Es la tasa de descuento que iguala el VAN a cero, está medida suele por lo general ser una estándar por continente (Lledó, 2022). En América y el Caribe, la tasa de mínima interna es del 12%, eso indica que los valores de la tasa interna de retorno deben apuntar a este valor como referencia para estimar una rentabilidad (Vilas et al., 2020).

$$VAN = 0 \tag{2.6}$$

### 2.6.4.3 Tiempo de retorno.

Es el tiempo en que el proyecto llega a su punto de equilibrio, es decir donde las ganancias se igualan en valores al costo de inversión. Es decir que a partir de ese tiempo todas las entradas representarían ganancias, sin embargo, este valor debe ser proporcional al tiempo de vida del proyecto (Lledó, 2022).

$$\sum_{n=1}^T BN_n = I \tag{2.7}$$

T = número de periodos necesarios para recuperar la inversión

## Capítulo 3

### 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

#### 3.1 Obtención de bioestimulante líquido

Como parte del alcance de este proyecto se determinó la medición de los parámetros fisicoquímicos del agua de mar donde fueron recolectadas las macroalgas. En la tabla 6 se muestra además las mediciones para el agua de enjuague de especie marina. Parámetros como pH y temperatura sirven para estimar la influencia de su entorno en el aspecto fisiológico, nutrientes, metabolismo y tasa de crecimiento, que pueden servir como referencia para el estudio del cultivo de esta especie y repetibilidad de este trabajo (du Jardin, 2015).

**Tabla 6**

Mediciones de parámetros fisicoquímicos en el proceso de recolección de la *Acanthophora spicifera*

Parámetros		Recolección	1° Enjuague	2° Enjuague
Masa de algas (kg)		16.2	15.3	14.1
Propiedades fisicoquímicas del agua de mar	pH	8.18	7.14	7.13
	Temperatura (°C)	27.9	29.6	29.7
	TDS* (ppt)	24.4	11.0	0.62
	Salinidad (ppt)	30.0	12.6	6.67
	Conductividad (mS/cm)	48.8	22.0	12.3

Nota: \*Sólidos totales disueltos.

Valores bajos en sólidos totales disueltos (TDS) con reducciones de 24.40 ppt a 0.62 ppt, aseguran la remoción de minerales y material orgánico residual propio del medio de crecimiento de la *Acanthophora spicifera*. Por otro lado, los enjuagues con agua destilada in situ permitieron reducir la salinidad y conductividad del agua, sin alterar de forma significativa su composición química (Ramírez et al., 2015).

Finalmente, la medición de los parámetros antes descritos permite asegurar una correcta recolección, lavado y transporte sin que el alga sufra alteraciones químicas en su composición o

se genere el crecimiento de bacterias que afecten luego la dificultad de su tratamiento y la calidad de producto final (Anwar et al., 2018).

### 3.1.1 Secado

Para el proceso de secado se emplearon 3.8960 kg de alga húmeda, las cuales se distribuyeron en las diferentes bandejas acondicionadas en el secador solar, obteniendo un rendimiento total de 0.181 kg de alga seca, en un tiempo de secado promedio de 4 días (Tabla 7). Las especies marinas como las macroalgas son características por un contenido de agua superior al 90%, de manera que una significativa reducción en el peso del alga obtenida mediante el secado al ambiente es el resultado que se espera al aplicar este tipo de técnica.

Por otra parte, cabe recalcar que se eligió este tipo de secado con el objetivo de reducir los costos operativos, aprovechando esta fuente de energía gratuita y abundante (Roche et al., 2016).

**Tabla 7**

Rendimiento del proceso de secado de la macroalga

<b>Bandeja</b>	<b>Masa de alga húmeda (kg)</b>	<b>Masa de alga seca (kg)</b>	<b>%Humedad (bh)</b>	<b>%Humedad (bh) Referencia</b>
1	1.4547	0.181	95	92
2	0.9704			
3	1.5071			

Implementar este tipo de técnicas simples y de bajo mantenimiento hace que esta técnica de secado sea una alternativa económica accesible y viable para los pequeños productores o comunidades de las zonas costeras, ya que por lo general son zonas con una atmósfera cálida por las altas temperaturas, pero también con presencia de viento en las noches (Tiwari, 2016).

Es importante mencionar que durante este proceso se debe tener control sobre el tiempo de exposición a la radiación solar de las algas al ambiente, y , de asegurar que el secado se dé por medio de las corrientes de aire circundantes. De esta manera se minoriza la pérdida de

componentes termosensibles de interés presentes en el alga, al mismo tiempo que se evita estas entren en un proceso de putrefacción (Medina & Morales, 2022).

Por otro lado, los resultados en esta etapa del proceso coinciden con investigaciones anteriores. Gavilanes y Titusunta en el 2023 reportan en su trabajo de investigación una humedad del 92% utilizando un secado al horno, lo que demuestra que el secado solar si bien consume más tiempo, sigue siendo eficiente en cuanto al uso de recursos y en resultados comparándolo con tecnologías más avanzadas.

### 3.1.2 Extracción sólido-líquida

El proceso de extracción sólido-líquida es una etapa sencilla, donde los parámetros que se controlan son agitación y temperatura. Considerando el tipo de materia vegetal, se estableció un rango de temperatura 60 °C con la finalidad de favorecer el proceso de extracción sin degradar el contenido bioactivo del alga. La cantidad de agua utilizada fue de 12 L para la cantidad de alga seca obtenida en la etapa anterior, lo que resultó en 10 L de extracto de *Acanthophora spicifera*. Durante el proceso se estimó un total de 2 L de pérdida, de las cuales gran parte represente material residual de alga húmeda, mientras que las pérdidas por volatilidad dada la temperatura de trabajo se consideran que fueron mínimas.

El extracto fue almacenado en botellas oscuras para protegerlas de la exposición de la luz, y se cuantificaron la fitohormona: de la kinetina; flavonoides como p-cumárico y catequina; los polifenoles totales y la actividad antioxidante cuyos resultados se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8**

Cuantificación de los ponentes bioactivos y actividad antioxidante del extracto acuoso

Componente Bioactivos		Extracto	Bibliografía (Medina & Morales, 2022;Cruz & Romero, 2023)
Flavonoides	Catequina (mg/L)	10.62	11.45
	p-cumárico (mg/L)	5.87	---

Fitohormonas	Kinetina (mg/L)	0.2645	0.20
Polifenoles (mg	Ácido Gálico/L	23.90	---
Actividad antioxidante DPPH (mg	Trolox/L)	41.71	---

La identificación de compuestos como la fitohormona kinetina es un punto positivo dentro del extracto, esta fitohormona es la encargada de regular el desarrollo y crecimiento de las plantas, retardar su envejecimiento y mejorar la calidad del fruto (Min et al., 2011). Por otro lado, flavonoides como p-cumárico y la catequina cuya característica principal son sus propiedades antioxidantes y de generan resistencia al estrés abiótico, mejoran su defensa y fortalecen su estructura celular; algo similar aportan los polifenoles

En diferentes trabajos de investigación reportados entre el 2022 y 2023 como muestra la tabla 8, se encuentran resultados similares. La catequina tuvo mayor concentración en comparación con este estudio mientras que en la fitohormona kinetina fue menor, probablemente influenciado por las temporadas de recolección, en el caso de la *Acanthophora spicifera* en invierno su composición bioactiva es más favorable (Cruz & Romero, 2023).

### 3.2 Diseño experimental

Con ayuda del software R y Rstudio se pudo definir el número de combinaciones para los factores concentración y proporción en los 3 niveles definidos en el capítulo anterior. En la tabla 9 se muestra la cantidad de maltodextrina y goma arábica para cada una de las combinaciones obtenidas, las cuales se usan para la preparación de la mezcla de encapsulantes que posteriormente se diluye en un volumen de control de 10 mL.

**Tabla 9**

Cantidad de encapsulante para cada una de las combinaciones del diseño experimental

Muestras	Encapsulante (%)	Proporción (M:G)*	Cantidad total de encapsulante (g)	Cantidad de maltodextrina (g)	Cantidad de Goma arábica (g)
1	0.35	1:1	3.85	1.93	1.93
2	0.25	1:1	2.75	1.38	1.38
3	0.35	2:8	3.85	0.77	3.08
4	0.15	8:2	1.65	1.32	0.33
5	0.25	8:2	2.75	2.20	0.55
6	0.15	2:8	1.65	0.33	1.32
7	0.15	1:1	1.65	0.83	0.83
8	0.25	2:8	2.75	0.55	2.20
9	0.35	8:2	3.85	3.08	0.77

Nota: \* M:G, M= maltodextrina, G= goma arábica

Durante la etapa de preparación de las muestras, donde se emplean las cantidades especificadas de encapsulantes obtenidos a partir del diseño experimental, se encontraron particularidades como el tiempo de disolución de los encapsulantes en el extracto acuoso.

Tomando en cuenta que se trabajó con una temperatura de mezcla en un rango de 40 a 55 °C, se observó que las muestras con mayor cantidad de goma arábica tomaron más tiempo en diluirse que las muestras que se preparan con menor cantidad de este agente encapsulante. Esto se debe a las características propias de la goma arábica, de ahí la importancia de generar mezclas con otros agentes encapsulantes, como la maltodextrina, para obtener mejores resultados en el proceso de disolución de las muestras.

### **3.2.1 Rendimiento de Encapsulado**

El rendimiento del proceso de microencapsulación que comprende etapas de encapsulación y liofilización fue determinado empleando la ecuación 2.1 descrita en la metodología, obteniendo resultados entre un 50 a 80 % de rendimiento entre las diferentes muestras, con valores de desviaciones estándar bajos según la tabla 10.

**Tabla 10**

Rendimiento del proceso de microencapsulación

<b>Muestras</b>	<b>Rendimiento Promedio</b>	<b>Rendimiento de micro encapsulado promedio <math>\pm</math> SD</b>
1	0.527	0.527 $\pm$ 0.009
2	0.771	0.771 $\pm$ 0.064
3	0.634	0.634 $\pm$ 0.029
4	0.769	0.769 $\pm$ 0.028
5	0.778	0.778 $\pm$ 0.053
6	0.398	0.398 $\pm$ 0.033
7	0.817	0.817 $\pm$ 0.081
8	0.649	0.649 $\pm$ 0.037
9	0.613	0.613 $\pm$ 0.143

Si se observa la tabla 10, la muestra 7 con proporción 1:1 (%p/p) maltodextrina – goma arábica y concentración 15% obtuvo el mayor rendimiento 81.7%. Comparando con la muestra 6 que tuvo el menor rendimiento 39.8 %, se observa que la única diferencia entre ambas fue la proporción de encapsulantes que se utilizó en la mezcla, ya que la muestra 6 también tiene una concentración del 15% de encapsulantes en extracto, pero se prepara con una proporción 2:8 (%p/p) maltodextrina – goma arábica.

De hecho, si nos fijamos en la muestra 4, con el mismo valor de concentración, pero con una proporción 8:2 (%p/p) tenemos un rendimiento promedio de 76.9%, lo cual indica que el rendimiento aumentó al añadir una mayor proporción de maltodextrina a una concentración de 15% de encapsulantes en extracto. Algo similar ocurre con las muestras con concentración de 35% de encapsulantes en extracto. Un estudio similar realizó Orrego, Ramírez y Giraldo, reportando mayores valores para rendimientos del 10-20 % extracto – encapsulante con proporciones superiores al 80% de maltodextrina (Ramírez et al., 2015).

Las muestras que reflejan una tendencia más clara son la 8, 2 y 5 con una concentración de 25% de encapsulantes en extracto, cuyos rendimientos son 64.9%, 77.1%, 77.8%, respectivamente. Como se observa, los rendimientos se maximizan conforme la proporción maltodextrina aumenta.



De acuerdo con investigaciones previas, trabajos que se han realizado con los mismo encapsulantes maltodextrina y goma arábica en diferentes proporciones (1:2, 1:1, 2:1) pero con diferente materia prima, allí reportan un rendimiento máximo de 64% con proporción 2:1, coincidiendo con los resultados antes descritos la favorabilidad que tiene el uso de mayor proporción de maltodextrina en esta mezcla de encapsulantes, maximizando así el rendimiento el proceso (Napiórkowska et al., 2023).

### 3.2.2 Análisis Fisicoquímicos

Como parte de las variables de salida del diseño experimental tenemos parámetros como humedad y solubilidad, ambas propiedades fisicoquímicas son de vital importancia para asegurar la estabilidad y calidad del producto final (Luca et al., 2014). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos para estos parámetros.

**Tabla 11**

Resultados de los análisis fisicoquímicos del bioestimulante sólido

Muestras	Humedad (% bh) $\pm$ SD		Solubilidad (%) $\pm$ SD	
	Bioestimulante	Bibliografía	Bioestimulante	Bibliografía
1	8.9 $\pm$ 0.64	0.5 – 1.5 (Napiórkowska et al., 2023)	40 $\pm$ 0.63	15-20 (Napiórkowska et al., 2023)
2	9.5 $\pm$ 0.19		31 $\pm$ 0.63	
3	8.9 $\pm$ 0.91		24 $\pm$ 1.43	
4	3.5 $\pm$ 0.24		22 $\pm$ 0.67	
5	5.3 $\pm$ 0.89		22 $\pm$ 0.85	
6	9.4 $\pm$ 0.57		29 $\pm$ 0.45	
7	6.7 $\pm$ 1.96		22 $\pm$ 0.09	
8	1.9 $\pm$ 0.72		23 $\pm$ 0.17	
9	3.4 $\pm$ 0.17		21 $\pm$ 0.36	

Los resultados de humedad de manera general son favorables, aunque algunos están al límite del objetivo propuesto. No se observa una tendencia clara en relación con concentraciones y proporciones de maltodextrina y goma arábica. Muestras como la seis y cuatro comparten la misma concentración 15% pero con proporciones inversas de estos componentes.

Esto en realidad tiene sentido, la concentración y proporción de encapsulante no tienen influencia significativa en humedad, que parecen estar ligados al proceso de secado, la

temperatura y tiempo de congelación. Muestras como la uno, dos, tres y seis tuvieron dificultad durante su secado debido a la disponibilidad del equipo mientras que muestras como la cinco, cuatro y nueve siguieron el tiempo planificado.

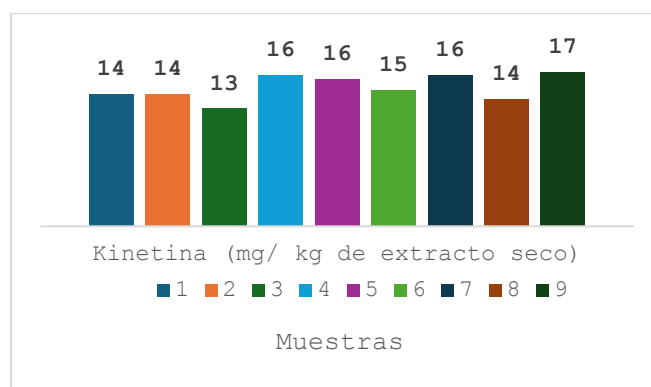
Por otro lado, en cuanto a solubilidad se debe destacar muestras como la uno, dos y seis que destacan justamente porque su contenido de humedad es mayor. Este parámetro es importante para evidenciar la compatibilidad del producto con principal solvente del sector agrícola que es el agua, ya que eso permite aumentar la capacidad de disolución de nutrientes y compuestos bioactivos, además de permitir que se apliquen en diferentes formas como foliar, riego, entre otros (Héctor-Ardisana et al., 2020).

### 3.2.3 Cuantificación de componentes bioactivos

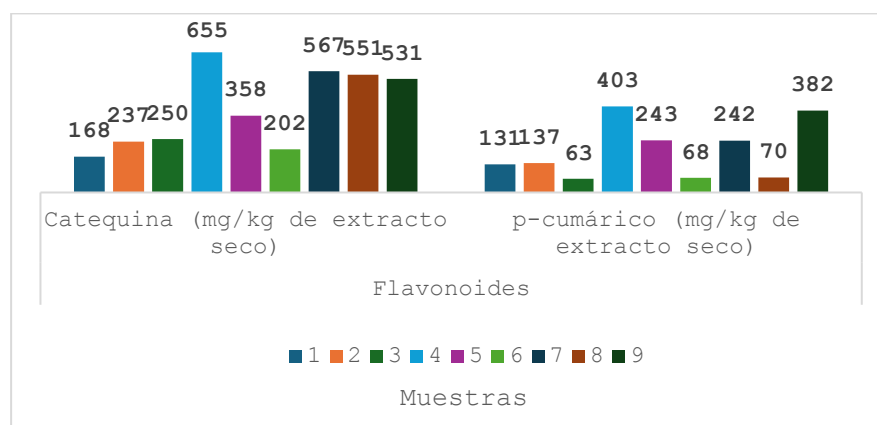
Para garantizar la aplicación del bioproducto como bioestimulante dentro del sector agrícola es importante determinar la presencia de componentes bioactivos, como la fitohormona kinetina, flavonoides totales, polifenoles totales y la actividad antioxidante. La caracterización por HPLC del extracto acuoso de algas liofilizado demuestra la presencia de compuestos bioactivos a diferentes cantidades, tal y como se muestra en la figura 7.

#### Figura 7

Cuantificación de componentes bioactivos por HPLC: a) Fitohormona: Kinetina, y b) Flavonoides: Catequina y p-cumático



a) Fitohormona: Kinetina



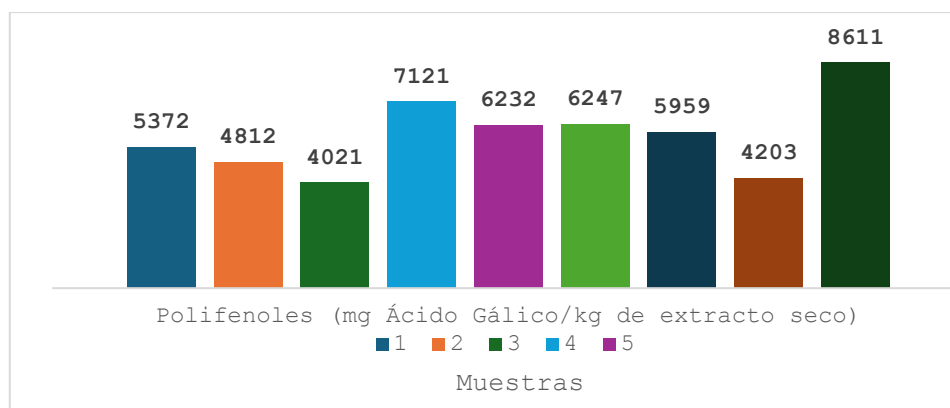
b) Flavonoides: Catequina y p-cumárico

Es importante conocer la presencia de estos compuestos bioactivo que aportan valor a nuestro producto final, la fitohormona como la kinetina (gráfica 2a ) es muy útil para favorecer y garantizar un buen desarrollo y crecimiento en las plantas mientras que los flavonoides (gráfica 2a ) como la catequina y el p-cumárico gestionan un mejor ambiente de crecimiento y alivia el estrés abiótico que viven las plantas en sectores agrícolas donde muchas veces su suelo se ve afectado por la variabilidad de las condiciones climáticas (Medina & Morales, 2022).

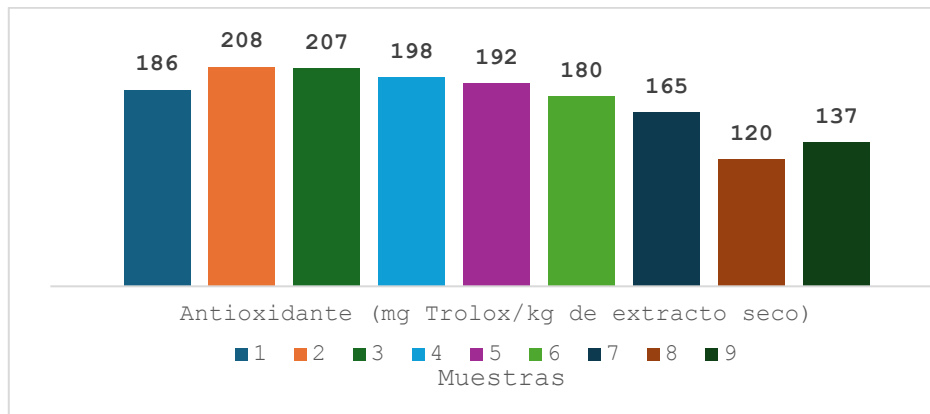
De hecho, la figura 8 muestra como los experimentos 4 y 9, resaltan en todas las pruebas en HPLC con concentraciones de 16 mg/kg de extracto seco y 17 mg/kg de extracto seco en fitohormonas, 655 mg/kg de extracto seco y 435 mg/kg de extracto seco en catequina y finalmente 403 mg/kg de extracto seco y 382 mg/kg de extracto seco.

### Figura 8

Cuantificación de Componentes bioactivos por espectrofotometría: a) Polifenoles totales por Follin Ciocalteu, y b) Actividad antioxidante por DPPH



a) Polifenoles totales por Follin Ciocalteu



b) Actividad antioxidantes por DPPH

Por otro lado, figura 8 evidencia por medio de la caracterización del extracto de algas liofilizado por espectrofotometría, la presencia de compuestos con propiedades altamente antioxidantes como los compuestos polifenólicos (gráfica 3a ). Cabe resaltar que los polifenoles fueron uno de los compuestos bioactivos que se encuentran en mayor concentración, esto sucede dado que la macroalga *Acanthophora spicifera* es una especie rica en componente antioxidantes. Estos compuestos a pesar de ser sensibles a la salinidad, a la luz y a altas temperatura se lograron conservar aplicando las técnicas de microencapsulación, lo cual significa que se obtuvo un bioestimulante sólido con contenido de polifenoles capaz de ayudar a que los cultivos liberen un poco su estrés abiótico lo que favorece la calidad en la cosecha (Jasso-Cantú et al., 2023).

Por otro lado, algo que llama la atención son las concentraciones de la fitohormona catequina, lo que nos lleva a considerar los puntos débiles del proceso que influyeron en este resultado. En primera instancia, el método empleado para la preparación de las disoluciones del extracto seco, para los ensayos por HPLC y por espectrofotometría, presentó dificultades ya que las muestras inicialmente no reflejaban una lectura de bioactivos. En base a ello, se concluye que los disolventes seleccionados y las cantidades empleadas no fueron las correctas, y por ende no permitieron la correcta lectura y cuantificación de componentes bioactivos en los equipos.

Por otra parte, como parte del diseño experimental, se realizó un análisis de correlación para nuestras variables de entrada y salida. La gráfica 4 muestra el diagrama de correlaciones realizado con los resultados tanto de los análisis fisicoquímicos como los resultados de cuantificación de compuestos bioactivos.

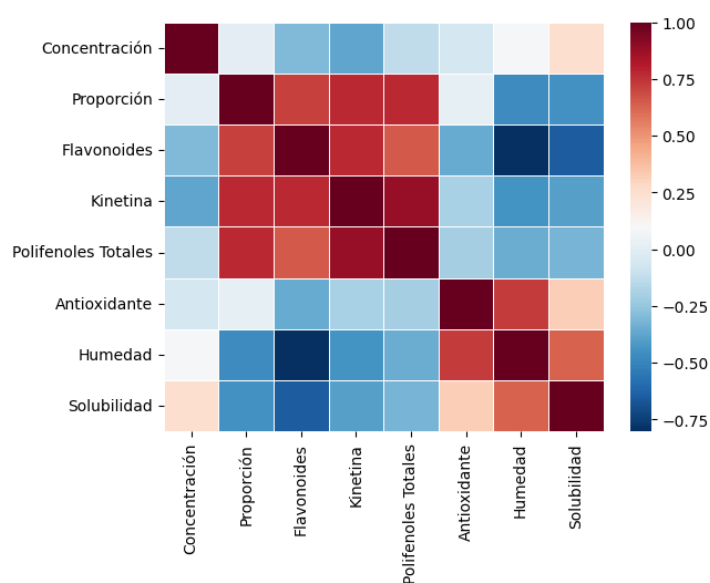
### 3.2.4 Estudio de Correlación

A través de una mapa de correlaciones nos permite identificar el comportamiento entre cada una de las variables de salida y, de entrada. Con ayuda de un indicador que va de -1 a +1 diferenciado a través de una paleta de colores de azul a rojo respectivamente, nos indican si la interacción entre dos variables es directamente proporcional (+1 rojo) o inversamente proporcional (-1 azul).

Por otra parte, como parte del diseño experimental, se realizó un análisis de correlación para nuestras variables de entrada y salida. La figura 9 muestra el diagrama de correlaciones realizado con los resultados tanto de los análisis fisicoquímicos como los resultados de cuantificación de compuestos bioactivos.

**Figura 9**

*Mapa de correlaciones con los resultados del diseño experimental*



Este tipo de diagrama es muy útil porque nos permite ver la influencia de las variables de entrada con las variables de salida. Es así como nos muestra que el contenido de flavonoides, kinetina y polifenoles totales con valor de correlación positiva superior al 0.5 con respecto a la proporción de los encapsulantes lo que indica una relación directamente proporcional. Todo contrario sucede con la actividad antioxidante, humedad y solubilidad estas dado su valor negativo de correlación son inversamente proporcional a dicha variable de entrada. Por otro lado, con la concentración la única variable directamente proporcional es la solubilidad mientras que las demás variables de salida poseen un valor de correlación negativa.

Finalmente, es importante recalcar que se ha identificado tanto en el bioestimulante sólido como el bioestimulante líquido los mismos compuestos bioactivos predominantes como la fitohormona kinetina y polifenoles totales lo que de agrega valor a nuestro proceso.

### **3.3 Simulación**

#### **3.3.1 Simulación de escala piloto**

Con la finalidad de conocer el proceso a escala piloto se logró simular cada una de las etapas basadas en el procedimiento a escala laboratorio descrito ya en la metodología. El proceso comienza con la entrada del alga, agua, fitohormonas y flavonoides mezclándose en el MIX-101, con un flujo de 3896 g/batch con respecto a la escala piloto.

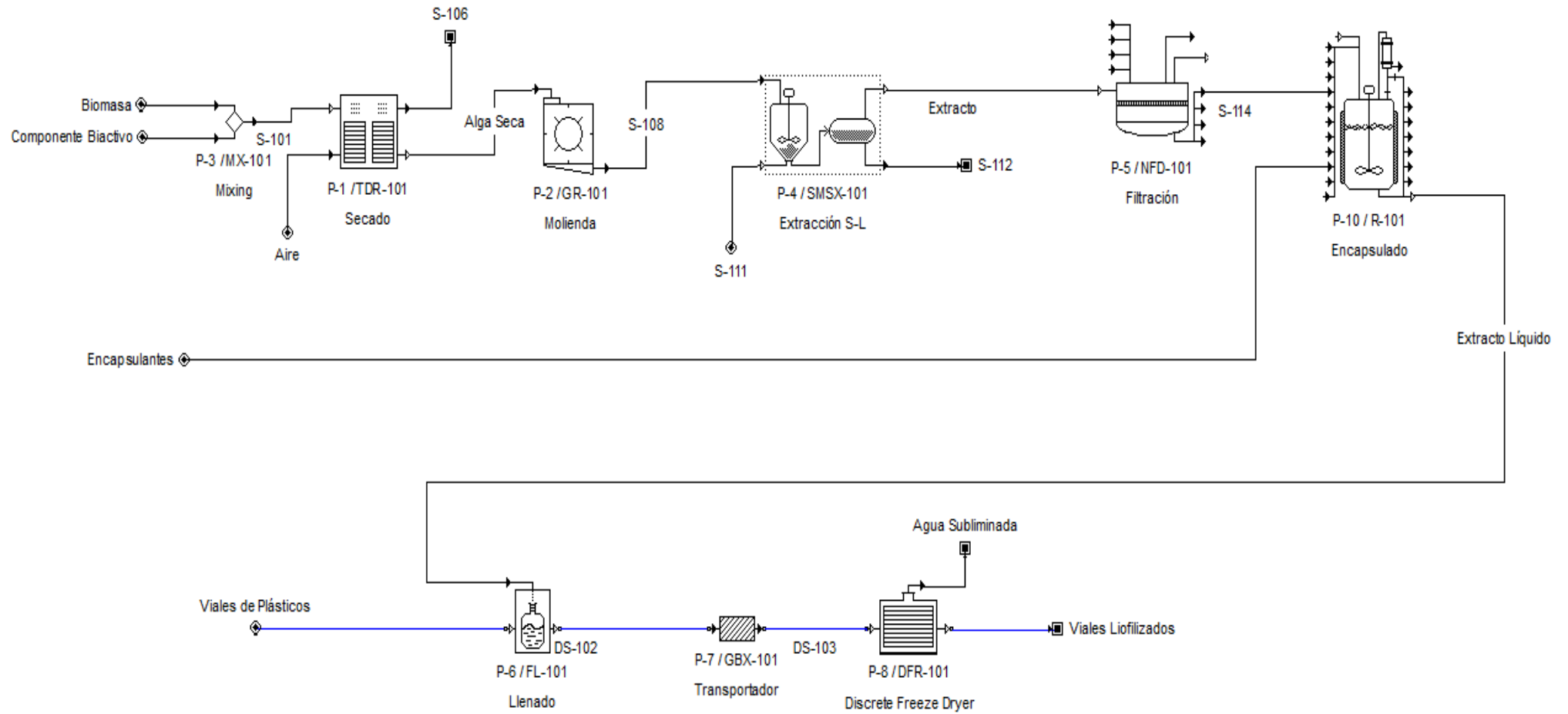
Posteriormente la mezcla de materias primas se seca en el secador solar de bandejas (TDR-101), durante 4 días a 31°C reduciendo el contenido de humedad hasta un 5%. Después del secado el alga pasa por un molino GR-101 como preparación previa a la etapa de extracción. Al extractor SMSX-101 ingresan 181 g/batch de alga y 12 L/batch de agua a condiciones ambientales, siguiendo la relación 1:70 sólido-líquido. Dentro del extractor, la mezcla de alimentación de materias primas y agua se agita y se calienta hasta 50°C. Al final de la operación, se obtuvieron 10 L/batch de bioestimulante. Luego, pasa por el filtro NFD-101 para la retención de partículas de alga sobrantes, para entrar en conjunto con los encapsulantes al proceso de microencapsulación

(R-101), finalmente son envasados (FL-101) para iniciar el proceso de secado por liofilización (DFR-101) y así se obtiene el bioestimulante sólido.

Sin embargo, si queremos simular un proceso más apegado a sector industrial realmente el proceso de liofilización discreto usado en la simulación a escala piloto no es el más común (du Jardin, 2015). Es así como para efecto del análisis tecno económico se procedió a cambiar el equipo liofilizador por un liofilizador por bandejas que es el típico equipo utilizado dentro de la industria, simulando así en la siguiente sección el proceso a escala industrial.

**Figura 10**

*Simulación de la producción del bioestimulante sólido a escala piloto*

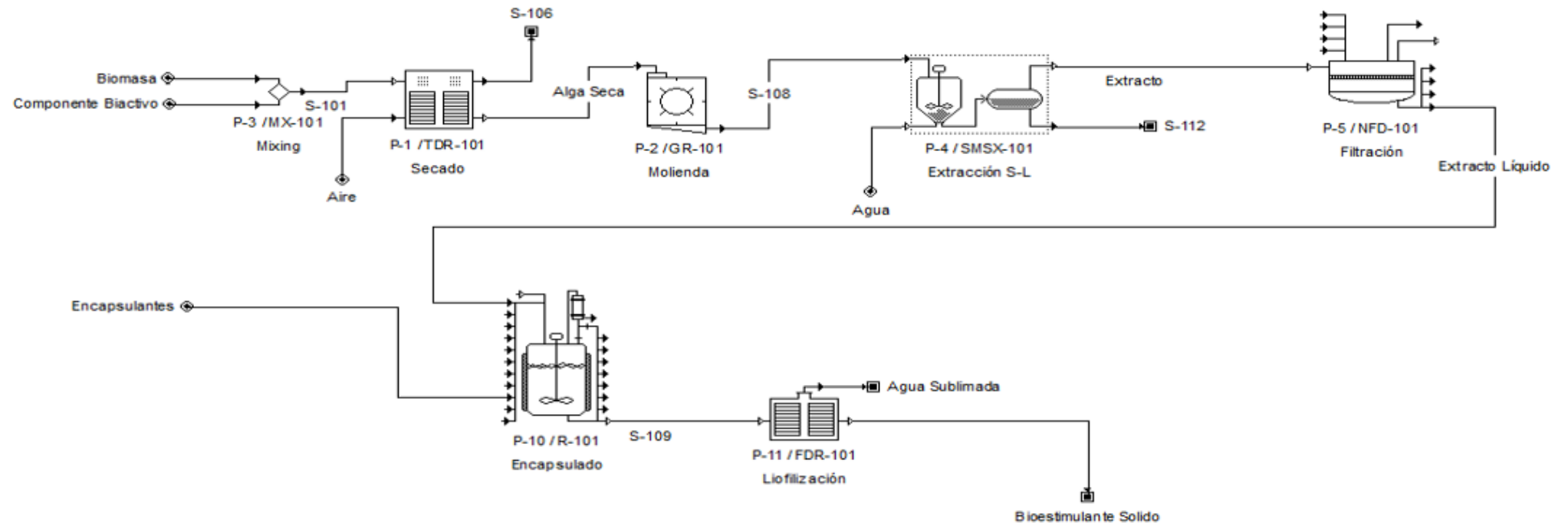




### 3.3.2 Simulación de escala industrial

Figura 11

Simulación de proceso de producción de bioestimulante sólido a escala industrial



Este proceso a escala industrial solo se diferencia de la escala piloto por el tipo de liofilizador. El liofilizador tipo bandejas es muy similar en forma al equipo de secador tradicional por bandejas solo que cambian el agente de transferencia por concepto fisicoquímico de cada proceso (Rey & May, n.d.).

En la simulación a escala industrial el proceso inicia con la mezcla de alga, agua, fitohormonas y flavonoides en el equipo MIX-101, con un flujo de 77 kg/batch. Luego, la mezcla se seca durante 4 días a 31°C en el secador solar TDR-101, reduciendo la humedad al 5%. Tras el secado, el alga se muele en el GR-101 y 3.61 kg/batch pasan al extractor SMSX-101 junto con 5101 L de agua. La mezcla se agita y calienta a 50°C, obteniéndose 3463 L de bioestimulante. Este pasa por el filtro NFD-101 para eliminar residuos de alga, y junto con los encapsulantes, se somete a microencapsulación en el R-101. Finalmente, se envasa y liofiliza en el DFR-101, obteniendo 150 kg/batch de bioestimulante sólido. En la tabla 12 se muestran las principales especificaciones de cada uno de los equipos utilizados en el proceso antes descrito.

**Tabla 12**

Especificaciones de los equipos de la simulación a escala industrial

<b>Equipo</b>	<b>Especificaciones</b>			
TDR-101	Tiempo de secado (días)		Temperatura final de sólido	
	4		31	
GR-101	Presión Operación (bar)		Tiempo de operación	
	1.013		60	
SMSX-101	Temperatura (°C)	Tiempo de mezclado (h)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de decantación
	55	3	250	15
NFD-101	Removido		Tiempo de Operación	
	10		30	
R-101	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de Operación	Proporción (%p/p)
	45	300	30	8:2
FD-101	Presión de vacío (mbar)		Tiempo de secado (h)	
	1		48	

Luego para efectos de validar los resultados de la simulación, se ha tomado como referencias los valores de concentración en unidades de mg/kg de extracto seco para la fitohormona kinetina y el flavonoide catequina tanto de la simulación como de la parte experimental, las cuales se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13**

Validación del caso de simulación para el proceso de obtención del bioestimulante

Componente	Concentración (mg/kg ext. Seco)		
	Simulación	Laboratorio	%Error
Catequina	0.6094	0.6548	6.938
Kinetina	0.0150	0.0164	8.550

Se observan porcentajes de error menos al 10 %, lo que garantizan resultados confiables del proceso, sin embargo, considerar que estos valores de error pueden deberse principalmente a la caracterización de los componentes bioactivos en el simulador. Si bien se ha tomado como referencia las propiedades determinadas por investigaciones anteriores llevadas a cabo en el CIBE, aún en ellos hacen mención que se podría ajustar mediante estudios termodinámicos dada la variabilidad que tienen estos compuestos de acuerdo con la zona de origen de la materia prima y su etapa de recolección, además de ciertas especificaciones importante que el simulador no permite configurar en equipos como el liofilizador, una etapa de alta significancia dentro del proceso.

### **3.3.3 Proyección tecnoeconómico; Escala Industrial**

En temas económicos es importante conocer los costos operativos relacionados a la puesta en marcha del proceso. En la tabla 14 se resumen los equipos principales del proceso y costo dentro del mercado. Sin embargo, considerando otros gastos como instrumentación, electricidad, utilidades, entre otros se llega a la suma total de 311,000\$ del costo directo total de la planta con un valor inicial de inversión de 580.000\$

**Tabla 14**

Costo de los equipos de operación para la escala industrial

Equipo	Unidades	Costo
M-101	1	\$ 1,000.00
GR-101	1	\$ 1,500.00
SMSX- 101	1	\$ 14,000.00
NFD-101	3	\$ 6,000.00
R-101	1	\$ 5,000.00
FD-101	6	\$ 48,000.00
Instalaciones y otros	----	\$ 28,000.00

*Nota: Véase Apéndice C para detalles de las especificaciones consideradas por equipo*

Con la finalidad de estimar criterios de rentabilidad se decidió definir un precio para el bioestimulante sólido microencapsulado que pueda competir dentro del mercado. Se ha hecho una revisión de productos similares dentro del mercado nacional, donde se encontró que no existe una gran variedad de productos similares para el sector agrícola, sin embargo, encontramos bioestimulantes líquidos a base de algas que se ofrecen en la tienda virtual “La Hectárea”<sup>2</sup> en rangos de 20\$ a 25w\$ el litro. Considerando que nuestro producto es sólido, no contiene conservantes y además tiene contenido bioactivo se ha definido un precio dentro del mercado de 35\$/kg.

Para evaluar si el proyecto es viable, se calcularon parámetros como valor actual neto (VAN), la tasa interna de retorno (TIR) y tiempo de retorno (PBP) con ayuda de mismo simulador SuperPro Designer. Criterios como la tasa de descuento establecido para el Ecuador según el CEPAL del 12% fue considerada para la generación del informe.

**Tabla 15**

Criterios de rentabilidad de la producción del bioestimulante sólido

Parámetros	Valor
VAN (\$)	474,000
TIR (%)	15
PBP (años)	6.3

<sup>2</sup> Página web: <https://lahectarea.com.ec/>

Es así como la tabla 15 muestra los índices económicos como el valor actual neto (VAN) cuyo valor es positivo, esto indica que la construcción y puesta en marcha de la planta simulada contendrá beneficios de rentabilidad. Por otro lado, otro criterio de gran importancia es la tasa interna de retorno (TIR) fue de 15% un valor superior a la tasa de descuento en Ecuador, indicando que el proyecto podrá cubrir el costo capital y un rendimiento adicional.

Finalmente, el criterio de tiempo de retorno resultó de 6.3 años para una proyección de tiempo de vida de 15 años, es decir que en ese tiempo se espera recuperar los fondos gastados y alcanzar el equilibrio para posteriormente luego de haber pasado el 42% el tiempo de vida útil comenzar a contabilizar ganancias netas.

## Capítulo 4

## 4.1 Conclusiones y recomendaciones

### 4.1.1 Conclusiones

- Mediante el diseño de experimento factorial se determinó el número de combinaciones necesarias para estudiar variables como concentración extracto – encapsulante y proporción de maltodextrina - goma arábica. De esta forma en función de los resultados obtenidos en el rendimiento se seleccionaron las muestras 2, 4, 6 y 7 las de mayor valor, sin embargo, fue la muestra 4 con concentración del 15% y proporción 8:2 (%p/p) de los encapsulantes la seleccionada debido a los resultados obtenidos en la cuantificación de componentes bioactivos.
- La muestra 4 evidenció poseer las más altas concentraciones de compuestos bioactivos kinetina (16 mg/kg e.s.), p-cumárico (403 mg/kg e.s) y catequina (655 mg/kg e.s); polifenoles totales (7121 mg/kg e.s.) y actividad antioxidante DPPH (198 mg/kg e.s.).
- La cuantificación de estos componentes garantiza el aporte del producto al desarrollo y crecimiento de las plantas, aliviando el estrés abiótico, mejorando la calidad del suelo y del fruto.
- El porcentaje del 3.5% de humedad y del 22.3% de solubilidad del extracto microencapsulado garantizan un almacenamiento seguro al ambiente y fácil uso.
- A través de un análisis tecnoeconómico, se definió que el precio del bioestimulante de 35\$ por kg, obteniendo un valor actual neto de 474,000\$, una tasa interna de retorno de 15% y un tiempo de retorno de 6.3 años. Lo que genera una alta expectativa a la propuesta pues los resultados en los criterios de rentabilidad confirman los beneficios y/o ganancias de su implementación.

#### ***4.1.2 Recomendaciones***

- Para futuros trabajos, se recomienda estudiar otros encapsulantes o en su defecto, variar parámetros de concentración y proporción para lograr una mayor conservación de fitohormonas en el Bioproducto, de tal manera que se logre brindar un mayor rango de aplicabilidad dentro del sector agrícola.
- Por otro lado, aportaría un gran valor estudiar dentro de un diseño de experimento las condiciones de operación del secado por liofilización. Dadas las limitaciones en cuanto al equipo empleado en este proyecto, sería recomendable estudiar en trabajos futuros la influencia de temperatura y presión de secado, así como el proceso de congelamiento sobre el producto final.
- Una vez demostrada la presencia de compuestos bioactivos en el bioestimulante sólido, es importante llevar a cabo un estudio sobre su aplicabilidad y dosificación en cultivos. Es decir, determinar de la dosis efectiva de acuerdo con el tipo de cultivo, especialmente sobre aquellos que dominan el sector agrícola en el Ecuador tal y como son el banano, arroz, maíz, pitahaya entre otros.



## 5 Referencias

- A Fisher, B. R. (2011). *Design of Experiments*.
- Abirami, R. G., & Kowsalya, S. (2017). Quantification and Correlation Study on Derived Phenols and Antioxidant Activity of Seaweeds from Gulf of Mannar. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 23(1), 9–17. <https://doi.org/10.1080/10496475.2016.1240132>
- Anias, O. R., Parrado, G., Echevarría Báez, D., Herrera Fernández, F., Díaz, P., Consuegra, S. B., Zamora Sánchez, J., Rodríguez Díez, V., & López Rodríguez, L. (2015). Automatización integral del proceso de secado de bioproductos. *RIELAC*, 2, 1–14.
- Anwar, E., Erianto, H., & Putri, K. S. S. (2018). Preparation of powder from brown seaweed (*Sargassum Plagyophyllum*) by freeze-drying with maltodextrin as a stabilizer. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 10(Special Issue 1), 348–353. <https://doi.org/10.22159/ijap.2018.v10s1.77>
- Ballesteros, L. F., Ramirez, M. J., Orrego, C. E., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2017). Encapsulation of antioxidant phenolic compounds extracted from spent coffee grounds by freeze-drying and spray-drying using different coating materials. *Food Chemistry*, 237, 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.142>
- Beltrán, E., & Vega, S. (2022). *Evaluación in vivo de extractos de Acanthophora spicifera como alternativa ecosostenible para combatir la vibriosis en Penaeus vannamei*.
- Buljeta, I., Pichler, A., Šimunović, J., & Kopjar, M. (2022). Polysaccharides as Carriers of Polyphenols: Comparison of Freeze-Drying and Spray-Drying as Encapsulation Techniques. *Molecules*, 27(16), 5069. <https://doi.org/10.3390/molecules27165069>
- Cruz, C. L., & Romero, L. A. (2023). *Cuantificación de flavonoides mediante técnicas cromatográficas en biomasa de macroalga Acanthophora spicifera recolectada en diferentes meses del año*.
- Da Silva, R. (2022). *Aplicación del diseño factorial para el estudio químico y biológico de Hypoxylon monticulosum, un hongo endofítico del alga Acanthophora spicifera*.
- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 3–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Espinosa, A., Hernández, R., & González. Mayelín. (2020). Extractos bioactivos de algas marinas como bioestimulantes del crecimiento y la protección de las plantas , <https://orcid.org/0000-0001-6207-445X>. *Artículo de Revisión Biotecnología Vegetal*, 20(4), 257–282.

- Fang, Z., & Bhandari, B. (2017). Encapsulation of polyphenols - A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 10, pp. 510–523). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Fernández Bao, S. (2020). *Diseño de experimentos: Diseño factorial*. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Gavilanes, K., & Titusunta, J. (2023). *Diseño a escala piloto de un aditivo nutraceutico y bioestimulante a partir de la macroalga Acanthophora spicifera*. Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- González, J. J. (2022). *El uso de algas marinas como bioestimulantes*.
- Guillen, F., Ayma, A., & Sanzeten, E. (2019). SupervivenciaycrecimientodeP.glomeratusenvivero2016 (1). *Foundation Rufford Small Grants. C*, 2–7.
- Héctor-Ardisana, E., Torres-García, A., Fosado-Téllez, O., Peñarrieta-Bravo, S., Solórzano-Bravo, J., Jarre-Mendoza, V., Medranda-Vera, F., & Montoya-Bazán, J. (2020). Influencia de bioestimulantes sobre el crecimiento y el rendimiento de cultivos de ciclo corto en Manabí, Ecuador. *Cultivos Tropicales*, 41(4), 2. <http://ediciones.inca.edu.cu/octubre-diciembre>
- Hernandez, S., Niño, L., & Gelves, G. (2021). Industrial scale bioprocess simulation of polyphenol production using SuperPro Designer. In *Journal of Engineering Science and Technology* (Vol. 16, Issue 3).
- Hosseinzand, H., Sokhansanj, S., & Lim, C. J. (2018). Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Drying Technology*, 36(9), 1049–1060. <https://doi.org/10.1080/07373937.2017.1369986>
- Jasso-Cantú, D., Rocha-Rivera, M. F., Ramírez-Rodríguez, H., Villarreal-Quintanilla, J. Á., Díaz-Jiménez, M. L. V., Rodríguez-García, R., & Carrillo Lomelí, D. A. (2023). Extractos de plantas como bioestimulantes de crecimiento, rendimiento y calidad de fruto en pimiento morrón. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(2). <https://doi.org/10.19136/era.a10n2.3559>
- Laureanti, E. J. G., Paiva, T. S., de Matos Jorge, L. M., & Jorge, R. M. M. (2023). Microencapsulation of bioactive compound extracts using maltodextrin and gum arabic by spray and freeze-drying techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126969>

- Li, H., Deng, Z., Zhu, H., Hu, C., Liu, R., Young, J. C., & Tsao, R. (2016). Highly pigmented vegetables: Anthocyanin compositions and their role in antioxidant activities. *Food Research International*, 46(1), 250–259. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.014>
- Lledó, P. (2022). *Comparación entre distintos criterios de decisión índice*. <https://pablollledo.com/content/articulos/03-03-07-Criterios-decision-Lledo.PDF>
- Luca, A., Cilek, B., Hasirci, V., Sahin, S., & Sumnu, G. (2014). Storage and Baking Stability of Encapsulated Sour Cherry Phenolic Compounds Prepared from Micro- and Nano-Suspensions. *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), 204–211. <https://doi.org/10.1007/S11947-013-1048-1/TABLES/5>
- Madende, M., & Hayes, M. (2020). Fish by-product use as biostimulants: An overview of the current state of the art, including relevant legislation and regulations within the EU and USA. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25051122>
- Martínez, O. LA, Esquivel, G. B., & Rutiaga, Q. O. (2015). Microencapsulación mediante secado por aspersión de compuestos bioactivos. In *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/81343176006>
- Medina, A. J., & Morales, M. S. (2022). *Identificación y cuantificación de fitohormonas en Ulva sp. y Acanthophora spicifera por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la propuesta de un bioproducto*.
- Medina Ballesteros, A. J., & Morales Mazzini, M. S. (2022). *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* [Escuela Superior Politécnica del Litoral ]. <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/57537/1/T-%20110489%20ALEXANDER%20MEDINA%20-%20MICHELLE%20MORALES%20.pdf>
- Min, B., McClung, A. M., & Chen, M. H. (2011). Phytochemicals and Antioxidant Capacities in Rice Brans of Different Color. *Journal of Food Science*, 76(1). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01929.x>
- Mohee, R., Mudhoo, A., Peryagh, C., & Somaroo, G. (2015). Composting of washed *Ulva reticulata* seaweed: process parameter variations and compost quality. In *International Journal of Environment and Waste Management and Journal* (Vol. 12, Issue 1).
- Murillo, R. A., Rubén, C., & Romo González, J. (2023). *Diseño de una planta piloto basado en la extracción de bioestimulantes de la macroalga *Kappaphycus alvarezii* con aplicación al sector agrícola*.

- Napiórkowska, A., Szpicer, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Perez, M. D. T., González, H. D., & Kurek, M. A. (2023a). Microencapsulation of Juniper and Black Pepper Essential Oil Using the Coacervation Method and Its Properties after Freeze-Drying. *Foods*, *12*(23). <https://doi.org/10.3390/foods12234345>
- Napiórkowska, A., Szpicer, A., Wojtasik-Kalinowska, I., Perez, M. D. T., González, H. D., & Kurek, M. A. (2023b). Microencapsulation of Juniper and Black Pepper Essential Oil Using the Coacervation Method and Its Properties after Freeze-Drying. *Foods*, *12*(23). <https://doi.org/10.3390/foods12234345>
- Orrego, C. Eduardo. (2018). *Congelación y liofilización de alimentos*. Gobernación de Caldas.
- Parra, R. A. (2015). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, *63*(2), 5669–5684. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179918602020>
- 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 Brasilica*, *31*(4), 555–565. <https://doi.org/10.1590/0102-33062017abb0059>
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. In *Scientia Horticulturae* (Vol. 196, pp. 49–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Ramírez, M. J., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2015). Modeling and stability of polyphenol in spray-dried and freeze-dried fruit encapsulates. *Powder Technology*, *277*, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.060>
- Revelo, S. C. J., & Jiménez, S. C. M. (2022). *Diseño de un Bioproceso a escala de laboratorio para la obtención de probióticos a partir de productos lácteos entregados por la Fundación Banco de Alimentos*.
- Rey, L., & May, J. C. (2015). *Freeze Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*.
- Rios-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: una revisión. *TecnoLógicas*, *24*(51), e1836. <https://doi.org/10.22430/22565337.1836>
- Roche, L., Hernández, J., & García, A. (2016). *Diseño conceptual de un secador solar a escala piloto para algas marinas*.
- Romero Ochoa, L. A., & Cruz Cordovez, C. L. (2023). *Cuantificación de flavonoides mediante técnicas cromatográficas en biomasa de macroalga *Acanthophora spicifera* recolectada en*

- diferentes meses del año [Escuela Superior Politécnica del Litoral].  
<https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/57f8d4a1-1346-463b-b6b6-8e0d71712c4b/T-110491%20CAMILA%20CRUZ-%20LUIS%20ROMERO.pdf>
- Roos, Y. H. (2012). *Effect of Moisture on the Thermal Behavior of Strawberries Studied using Differential Scanning Calorimetry*.
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2019). Ascophyllum nodosum-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00655>
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(50), 20260–20264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>
- Tiwari, A. (2016). A Review on Solar Drying of Agricultural Produce. *Journal of Food Processing & Technology*, 7(9). <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000623>
- Valdez, A. N., Choez, I., Van Der Hende, S., Ruiz, O., & Manzano, P. (2023). Optimal conditions for the extraction of antioxidant compounds from the red alga *Acanthophora spicifera*. *Bionatura*, 8(1). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.01.11>
- Vilas, C., Alonso, A. A., Balsa-Canto, E., López-Quiroga, E., & Trelea, I. C. (2020). Model-based real time operation of the freeze-drying process. *Processes*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/pr8030325>
- Viteri, R., Giordano, A., Montenegro, G., & Zacconi, F. (2022). *Eucryphia cordifolia* extracts: Phytochemical screening, antibacterial and antioxidant activities. 36(16), 4177–4181. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960525>
- Wahidulla, S., Souza, L. D', & Kamat, S. Y. (1986). *Chemical Constituents of the Red Alga Acanthophora spicifera: Vol. XXIX*.
- Zea, F. (2023). *Evaluación de una unidad piloto para la producción de una bebida con propiedades nutraceuticas*.
- Zeng, L.-M., Wang, C.-J., Su, S. J., Jj, J.-Y. ', Dub, Owen, ), Lu, N. L. ', Yang'( S B, Lu, Zheng, Q., & -Tai'. (2001). Flavonoids from the Red Alga *Acanthophora spicifera*. In *CHINESE JOURNAL OF CHEMISTRY* (Vol. 19).

## APÉNDICES A: *Simulación en Rstudio*

### Código en RStudio del diseño experimental $3^K$

```
# Definir los niveles de los factores
levels <- list(Factor1 = c(-1, 0, 1), Factor2 = c(-1, 0, 1))
# Generar el diseño factorial completo
design <- expand.grid(levels)
# Mostrar las combinaciones de los experimentos
cat("Combinaciones de los experimentos:\n")
print(design)
```

**Resultados del código:** el número necesario de experimentos mediante el diseño factorial completo  $3^K$  y las combinaciones posibles de los niveles de los factores.

```
> # Definir los niveles de los factores
> levels <- list(Factor1 = c(-1, 0, 1), Factor2 = c(-1, 0, 1))
> # Generar el diseño factorial completo
> design <- expand.grid(levels)
> # Mostrar las combinaciones de los experimentos
> cat("Combinaciones de los experimentos:\n")
Combinaciones de los experimentos:
> print(design)
  Factor1 Factor2
1      -1      -1
2       0      -1
3       1      -1
4      -1       0
5       0       0
6       1       0
7      -1       1
8       0       1
9       1       1
```



## APÉNDICES B: *Escala Piloto*

### Recolección materia prima – Ballenita



### Secador de bandeja solar



**Secado de materia prima: alga *Acanthophora spicifera***

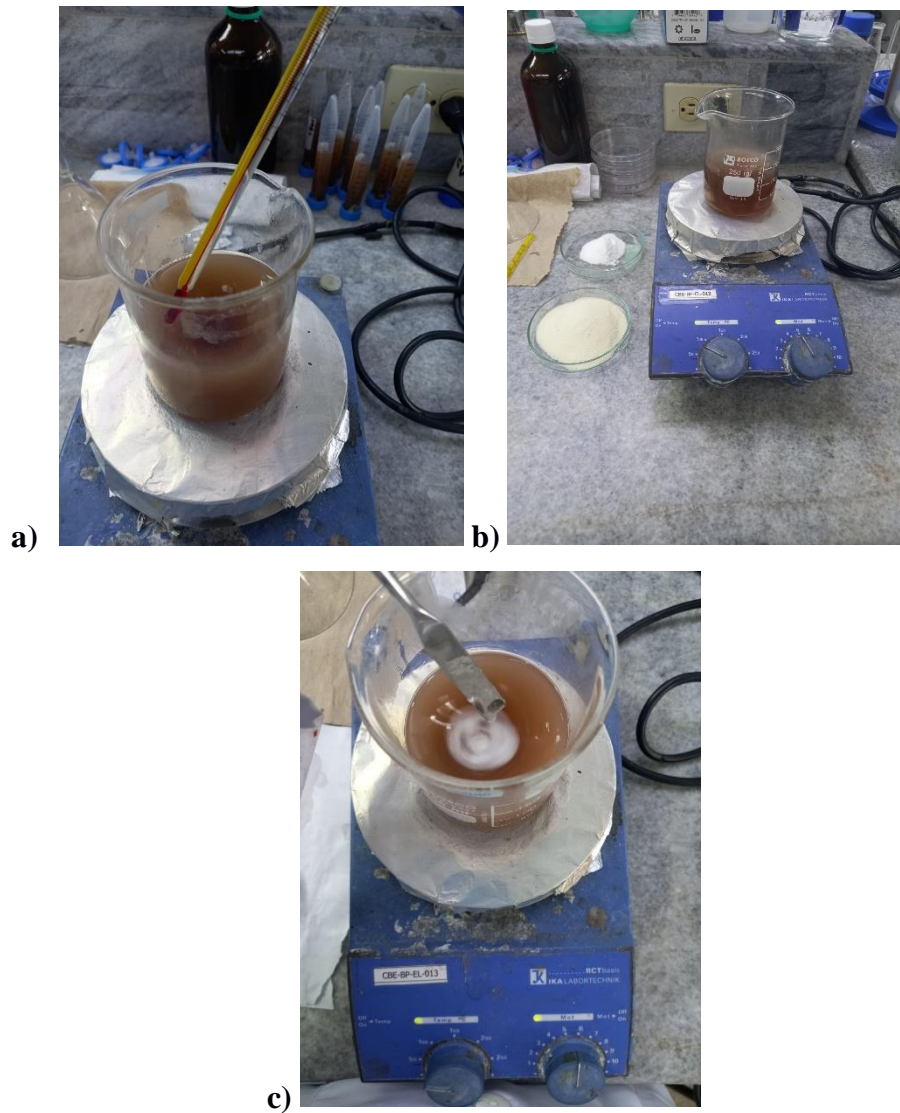


**Digestor del Laboratorio de Operaciones Unitarias utilizado para la extracción sólido-líquido, a escala piloto**





## Preparación de extracto acuoso microencapsulado con maltodextrina y goma arábica



Nota: Se prepararon nueve muestras con las cantidades de encapsulantes especificadas en la tabla 9 en 50 mL de extracto acuoso de algas.

a) Extracto acuoso de algas. b) Mezcla de encapsulantes en extracto acuoso. c) Muestra de 50 mL de extracto acuosos microencapsulado.

**Almacenamiento de las muestras de extracto acuoso microencapsulado en viales de 10 mL en el congelador del laboratorio del Centro de Biotecnología**



**Liofilización de las muestras de extracto acuosos encapsulado en el laboratorio de Ecotoxicología**



**Muestra de extarcto microencapsulado seco**



**Botellas ámbar de 25 mL para almacenar el extracto liofilizado**

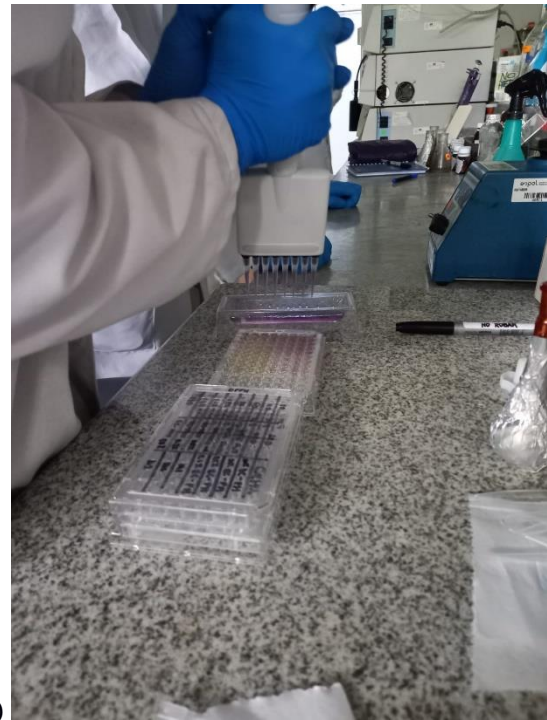
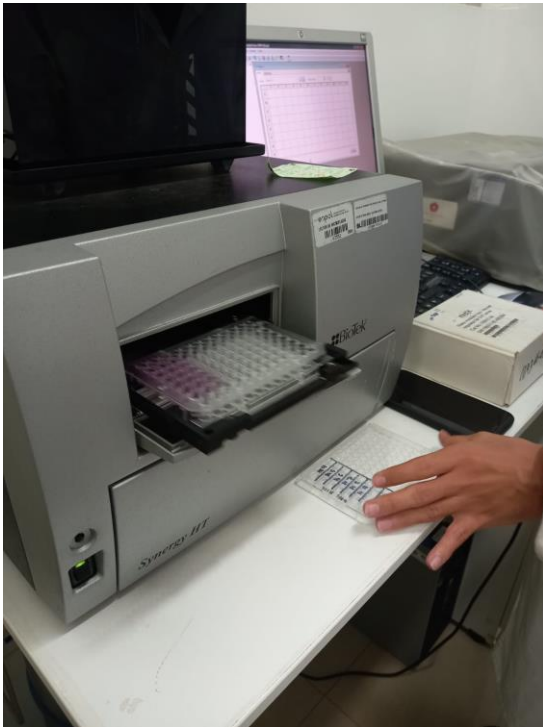




## Ensayos para medir humedad y solubilidad del extracto microencapsulado seco en el laboratorio de Termodinámica



## Ensayos para cuantificación de bioactivos



a)

b)

Nota: a) Ensayo DPPH para la cuantificación de actividad antioxidante. b) Equipo lector de microplacas empleado para la cuantificación de actividad antioxidante y polifenoles totales por espectrofotometría.

### **APENDICE C: Especificaciones de Equipos en el Mercado**

Los precios descritos en el capítulo 3 fueron seleccionados de acuerdo con las siguientes especificaciones:

<b>Equipo</b>	<b>Especificaciones</b>			
TDR-101	Capacidad (Ton/h)		Motor (kW)	
	0.8-2.5		3-4	
GR-101	Capacidad (kg/h)		Voltaje (V)	
	40		110-240	
SMSX-101	Capacidad (L)	Prensa (Mpa)	Vapor (kg/h)	Prensa Interior (Mpa)
	10000	0.2-0.8	285-1140	0.09
NFD-101	Tipo		Presión max (Bar)	
	Duplex		10	
R-101	Rendimiento (L/h)	Motor (kW)	Capacidad	Velocidad (R/min)
	5000	3-5.5	1000-5000	32-2000
FD-101	Capacidad de Evaporación (kg/h)	Temperatura (°C)	Numero de bandejas	Potencia (Kw)
	5	-70- 90	40	65