



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

"DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y FITOHORMONAS DE LA MACROALGA
ACANTHOPHORA SPICIFERA DE LA PENÍNSULA DE SANTA ELENA - ECUADOR".

Trabajo de titulación Previo a la obtención del Título de Magister en
Biociencias Aplicadas con Mención en Biodescubrimiento

Presentado por: Arianna Lizbeth Valdez Navarro

Guayaquil – Ecuador, 2022

AGRADECIMIENTO

Mis más sinceros agradecimientos a la PhD Patricia Manzano Santana y Msc. Iván Chóez, quienes por su amplio conocimiento y experiencia han sido clave imprescindible en cada etapa del desarrollo de esta investigación.

Al PhD Omar Ruíz por su invaluable aporte en cada tutoría.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, por haberme brindado la oportunidad de seguir enriqueciendo mis conocimientos.

Al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador por toda la disposición brindada en sus laboratorios.

A la PhD Sofie Van Der Hende por proveer la materia prima y guía para la realización de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A Dios por permitirme llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre, que sin ella no lo habría logrado.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN



Firmado electrónicamente por:
ROBERTO CARLOS
BURBANO
VILLAVICENCIO

Roberto Burbano Villavicencio, PhD.

Presidente del tribunal



Firmado electrónicamente por:
PATRICIA ISABEL
MANZANO SANTANA

PhD. Patricia Manzano Santana

JacomeTutor



Firmado electrónicamente por:
DAVID ENRIQUE
VANEGAS JACOME

PhD(c). David Vanegas

Cotutor



Firmado electrónicamente por:
ANDREA KATHERINE
ORELLANA MANZANO

Ph.D Andrea Orellana Manzano,

Evaluador

Ph.D Edwin Vera

Evaluador

DECLARATORIA EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de este trabajo de titulación, me corresponde exclusivamente y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

ARIANNA LIZBETH

VALDEZ NAVARRO

Firmado digitalmente por
ARIANNA LIZBETH VALDEZ
NAVARRO

Fecha: 2024.04.01 11:39:48
-05'00'

ING. QCA. Arianna Lizbeth Valdez Navarro

RESUMEN

La *Acanthophora spicifera* un alga roja de fácil adaptación a diferentes condiciones ambientales, por su capacidad de regenerarse por fragmentación, convirtiéndola en una especie invasora en áreas tropicales y subtropicales. Además, es conocida por sus componentes bioactivos (antioxidantes, fitohormonas, fitopigmentos). En este estudio se plantea determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes de la macroalga que crece en la zona intermareal de la playa de San Pedro de la provincia de Santa Elena, en dos procesos de secado (horno y liofilización) y extracción etanólica (digestión y sonicación) a diferentes concentraciones de etanol (50% y 70%) en rangos de tiempo y temperatura para su posterior determinación de actividad antioxidante por los métodos DPPH, ABTS, fenoles, flavonoides y auxinas totales en microplacas. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) usando el software estadístico R.4.2.0 e InfoStat, observan que los mejores resultados se dieron por digestión con una concentración de etanol al 50% y se obtuvieron valores para: la actividad captadora de radicales DPPH 3.65 ± 0.011 $\mu\text{mol ET/g ps}$, mayor actividad inhibidora del radical catiónico ABTS 14.06 ± 0.03 $\mu\text{mol ET/g ps}$, para flavonoides 1278.58 ± 2.94 $\mu\text{g EQ/g ps}$, para fenoles 900 ± 0.129 $\mu\text{g GEA/g ps}$, y para en auxinas 0.287 ppm en 10 gramos de muestra seca

Las condiciones óptimas para la extracción etanólica de la macroalga *A. spicifera.*, fueron 47 °C y 47 minutos para la actividad captadora de radicales DPPH y 47 °C y 39 minutos para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS, 45 °C y 37 minutos para Fenoles totales y 43 °C y 38 minutos para Flavonoides totales, estos valores óptimos aplican a extractos obtenidos a partir de las algas deshidratadas bajo las condiciones evaluadas. Los resultados obtenidos sirven para futuros bioproductos que contengan los principios activos de la *A. spicifera.*

Palabras clave: actividad antioxidante, fitohormonas, *Acanthophora spicifera*, extracción.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	IV
ABREVIATURAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	1
1.2 OBJETIVO GENERAL	3
1.3 OBJETIVO ESPECIFICO	3
1.4 MARCO TEÓRICO	4
1.4.1 Algas	4
1.4.2 Fitohormonas	5
1.4.3 <i>Acanthophora spicifera</i> (M.Vahl) Børgesen	7
CAPÍTULO 2	9
METODOLOGÍA	9
2.1 Diseño estadístico de experimento	10
2.2 Recolección y preparación de materia prima	10
2.3 Análisis de los métodos de secado	10
2.4 Obtención de extractos	11
2.5 Ensayos de actividad antioxidante	11
2.5.1 Ensayo DPPH	11
2.5.2 Ensayo ABTS	11
2.6 Determinación de fenoles y flavonoides totales	12
2.6.1 Contenido de fenoles totales	12
2.6.2 Contenido flavonoides totales	12
2.7 Fitohormonas	13
2.7.1 Purificación del extracto concentrado	13
2.7.2 Detección y cuantificación de auxinas	13
2.8 Análisis estadísticos	14
CAPÍTULO 3	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1 Análisis de los métodos de secado	15
3.2 Análisis de variables de extracción	15

ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
AIA	Ácido indol-3-acético
ANOVA	Análisis de varianza
CE	Equivalentes de catequina
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
CK	Citoquinina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazilo
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
GAE	Equivalente de ácido gálico
<i>A. spicifera</i>	<i>Acanthophora spicifera</i>
pf	Peso fresco
ps	Peso seco
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente de trolox
TFC	Flavonoides totales
TPC	Polifenoles totales

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 SÍNTESIS DE TRIPTÓFANO EN ACIDO INDOL-3-ACÉTICO	6
FIGURA 3 MOVIMIENTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO(43)	7
FIGURA 4 <i>ACANTHOPHORA SPICIFERA</i> (M.VAHL) BØRGESEN	8

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD CAPTADORA DE RADICALES DPPH.....	17
GRÁFICO 2 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DEL RADICAL CATIONICO ABTS.....	18
GRÁFICO 3 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES.....	18
GRÁFICO 4 EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL TIEMPO DE EXTRACCIÓN SOBRE EL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES	19
GRÁFICO 5 RESULTADO COMPARATIVO DEL ALGA ACANTHOPHORA SPICIFERA DE ECUADOR E INDIA.....	20

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 MEJOR EXTRACCIÓN A TEMPERATURA Y TIEMPO PARA DPPH Y ABTS.....	15
TABLA 2 MEJOR EXTRACCIÓN A TEMPERATURA Y TIEMPO PARA FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES	16
TABLA 3 DATOS DE CONTENIDO DE HUMEDAD Y RENDIMIENTO DE SECADO POR HORNO DE BANDEJA	28
TABLA 4 DATOS DE CONTENIDO DE HUMEDAD Y RENDIMIENTO DE SECADO POR LIOFILIZACIÓN	28
TABLA 5 MEJORES RESULTADOS DE EXTRACCIÓN	28

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

1.1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

En países orientales las algas marinas se han utilizado antiguamente como fuente de alimentación, de manera especial las *Rhodophyta* o algas rojas que son muy importantes no solo por agrupar alrededor de 7000 especies, sino que también son una excelente fuente de minerales, fibras, proteínas y vitaminas, también contienen ficocoloides muy empleado en Europa para la elaboración de productos biomédicos, artículos del hogar y alimentos industrializados (Gómez-Ordóñez, 2013; Quitral R. et al., 2012).

Las microfloras marinas producen nuevos químicos para soportar variaciones extremas de presión, salinidad, temperatura, etc., prevalentes en su ambiente, y los químicos producidos son únicos en diversidad, características estructurales y funcionales por lo que siguen siendo la mejor fuente de productos químicos de la naturaleza (Kathiresan et al., 2008).

Las algas y manglares contienen altas cantidades de polifenoles como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianidinas, lignina, taninos, catequina, epicatequina, epigallocatequina y ácido gálico (Bandaranayake, 2002; Yoshie et al., 2002). Estos compuestos polifenólicos han mostrado muchas bioactividades beneficiosas para la salud, como antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, antiinflamatorios y la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria humana (Fan et al., 2001).

La mayoría de los compuestos antioxidantes activos son flavonoides, isoflavonas, flavonas, antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas e isocatequinas; las vitaminas C y E, el β -caroteno y el α -tocoferol presentes en los alimentos naturales están reportados como antioxidante (Cai et al., 2004; Kaur & Kapoor, 2009), en este sentido el alga roja *Osmundea pinnatifida* ha sido documentada por poseer estos atributos a más de antimicrobianas, antifúngicas y antileishmanial (Rizvi & Shameel, 2004)

Es importante mencionar que las algas frescas tienen un alto contenido de humedad, dependiendo de la especie puede tener hasta en un 85%. Por lo tanto, el uso de algas marinas como ingrediente en la industria alimentaria a menudo requiere que se deshidrate antes de su uso (Gupta et al., 2011), ya que el secado inhibe la actividad

microbiológica y ralentiza o detiene las reacciones químicas que causan el deterioro de los alimentos (es decir, oxidación o reducción), prolongando así la vida útil (Gupta et al., 2011; Gupta & Abu-Ghannam, 2011) y ayuda a la extracción de ciertos componentes químicos (Ito & Hori, 1989).

Los procesos de secado más comunes utilizados para las algas marinas son: el secado al sol, el secado al horno y la liofilización (Ling et al., 2015), el procesamiento de cada método puede cambiar la composición química y las propiedades antioxidantes de las algas destinadas a ser utilizadas como bioproductos funcionales para alimentos y piensos (alimento para el ganado), aplicaciones cosméticas, farmacéuticas e industriales (Jiménez-Escrig et al., 2001; Le Lann et al., 2008). Si bien existen diferentes técnicas de secado disponibles, varios factores como el costo, el consumo de energía, la efectividad y el impacto en la calidad de los alimentos deben tenerse en cuenta al seleccionar el método más apropiado (Chen et al., 2015; Stramarkou et al., 2017).

Sin embargo, cuando se seca al sol, las algas marinas se exponen al aire libre a la luz solar directa, donde hay una gran oportunidad de contaminación en el aire (es decir, con partículas, microbios, etc.) que luego pueden afectar la calidad e higiene del producto final (Wong & Chikeung Cheung, 2001).

Diferentes estudios han demostrado el valor de selección de tratamientos de secado apropiados para preservar compuestos bioactivos importantes de las algas destinadas a diferentes procesos (Kadam et al., 2015), aunque existen pocos estudios que describan los efectos de los procesos de secado en los extractos de algas marinas (Rioux et al., 2017), el interés en este tema ha aumentado en los últimos años (Badmus et al., 2019; Chenlo et al., 2018).

Los principales antioxidantes encontrados en las algas marinas son compuestos fenólicos y pigmentos fotosintéticos (clorofilas, carotenoides y ficobiliproteínas), que también son conocidos por sus actividades biológicas (anticancerígenas, antiinflamatorias, antiobesidad y antiangiogénicas) (Pangestuti & Kim, 2011). Sin embargo, tanto los compuestos fenólicos como los pigmentos son susceptibles a la oxidación, especialmente a altas temperaturas (Humphrey, 2006). Además, las algas marinas se consideran una fuente alternativa de proteínas, carbohidratos, ácidos grasos y minerales, que pueden sufrir degradación a temperaturas elevadas y pérdida de agua.

La *A. spicifera*. es un alga roja nativa del Caribe y las costas de Florida, actualmente está registrada como especie invasora en las islas del Pacífico Central (Russell, 1992; Tsuda et al., 2008). Su plasticidad morfológica, estrategias reproductivas (sexual y asexual), adaptación a condiciones ambientales y capacidad de regenerarse por fragmentación, la han convertido en una especie de reproducción exitosa (Smith et al., 2002).

En Ecuador existen varios tipos de macroalgas que son utilizadas en las industrias de otros países como *Ulva*, *Chaetomorpha*, *Dictyota*, *Padina* en área alimenticia como salsas o suplementos alimenticios; *Enteromorpha* como un inhibidor de bacterias patógenas, *Sargassum* usada como gel y fertilizante, *Gelidium*, *Gracilaria* y *Gracilariopsis* y en menor escala de las especies de *Acanthopeltis*, *Ahnfeltia*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *Hypnea*, *Ceramium*, *Pterocladia*, *Griffithsia*, *Lithotamniun*, *Grateloupia*, *Ahnfeltia* usadas para la producción de agar y de carragenano (Pesca, 1994). De manera particular la macroalga *A. spicifera* se tiene pocos datos sobre sus componentes bioactivos (antioxidantes, fitohormonas, fitopigmentos), sólo reportan la influencia de esta alga sobre la alimentación de tortugas marinas (Valverde Velásquez, 2018) y la utilidad en procesos de biorremediación de aguas (Vaca Sandoya, 2018).

Por lo anterior descrito, el presente estudio plantea como objetivo determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes y fitohormonas del alga roja *A. spicifera* empleando diferentes métodos de secado para preservar la calidad de los biocomponentes del producto final, con miras a un escalado comercial.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar las condiciones óptimas de extracción de compuestos antioxidantes y fitohormonas del alga roja *Acanthophora spicifera* empleando diferentes métodos de secado para preservar la calidad de sus biocomponentes.

1.3 OBJETIVO ESPECIFICO

1. Analizar los métodos de secado por horno de bandeja y por liofilización que permita conservar las propiedades de los biocomponentes de la macroalga.
2. Optimizar la concentración de antioxidantes de los extractos etanolicos de *A.spicifera* mediante sonicación y digestión utilizando metodología de respuesta.

3. Determinar la concentración de auxinas totales de extractos etanolicos por medio de digestión.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Algas

Las algas en el ecosistema acuático son organismos muy diversos e importantes al ser refugio y alimentos para las especies acuáticas (CONABIO, 2017), el uso del alga viene desde tiempos antiguos en países orientales como Japón y China como fuente de alimento por su contenido en minerales, fibras, vitaminas y proteínas, por otro lado, los países occidentales las han usados para usos farmacéuticos y cosméticos. Las algas al poseer diversas estrategias de adaptación que les permiten aclimatarse a diferentes condiciones de estrés ambiental a las que se ven expuestas (De et al., 2014), que las convierten en un recurso económico y atractivo de materia prima en la elaboración de alimentos y obtener pigmento natural en el que se destaca la fucoxantina, carotenoide que incluye un enlace alénico y 5,6-monoepoxido en su molécula (Quitral R. et al., 2012).

En los mares las algas están expuestas constantemente a la luz solar lo que puede conducir a la formación de radicales libres, de manera que la ausencia de daños oxidativos de sus componentes estructurales y fisiológicos evidencian que estos organismos presentan un eficiente sistema de defensas antioxidantes (Gutierrez et al., 2015) En diferentes investigaciones se ha demostrado una relación directa entre el consumo de algas marinas y la prevención y/o en el tratamiento de patologías relacionados con el estrés oxidativo en experimentos con modelos animales y cultivo de células resultados satisfactorios (DA et al., 2018; Y et al., 2019), entre los antioxidantes se encuentran compuestos lipofílicos como ácidos grasos insaturados, clorofila y carotenos; compuestos hidrofílicos como polifenoles y vitamina C; y polisacáridos (Batista González et al., 2009).

Las algas taxonómicamente se las ha agrupado en tres grandes grupos que son: Chlorophyta o clorofitas, Phaeophyta o feófitas y Rhodophyta o rodófitas, comúnmente llamadas algas verdes, pardas y rojas respectivamente.

1.4.2 Fitohormonas

Las fitohormonas son moléculas químicas que se encuentran en diferentes concentraciones en las plantas que afectan su desarrollo (Universidad Politécnica de Valencia, n.d.) Para que las plantas se puedan desarrollar con normalidad depende de varios factores externos e internos (Bedon Romero, 2011), en este último se encuentran sustancias químicas llamadas hormonas vegetales o fitohormonas (Medina Huaman, 2016), se sintetizan en diferentes partes de la planta, responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética de la planta (Córdova Ruiz, 2019) Existen diferentes tipos capaces de promover o inhibir el crecimiento vegetal y bajo diferentes estudios se ha podido clasificar dependiendo su actividad o capacidad estimulante (Alcantara Cortes et al., 2019), las más conocidas y estudiadas son: Auxinas, Citoquininas y Giberelinas

1.4.2.1 Auxinas

Las auxinas son las más conocidas por controlar varios aspectos de desarrollo de la planta en conjunto con la respuesta del medio ambiente. Dentro de sus efectos a nivel celular podemos encontrar que promueve la elongación y división celular, aumenta el contenido de osmótico celular, aumento de producción proteica, entre otras, mientras que a nivel vegetal promueve la formación y elongación de tallo y de las raíces (Alcantara Cortes et al., 2019). Dentro del grupo de las auxinas la más destacada es el Ácido Indo-Acético (AIA) (Córdova Ruiz, 2019) que se sintetiza a partir del aminoácido triptófano como observa en la figura 2.

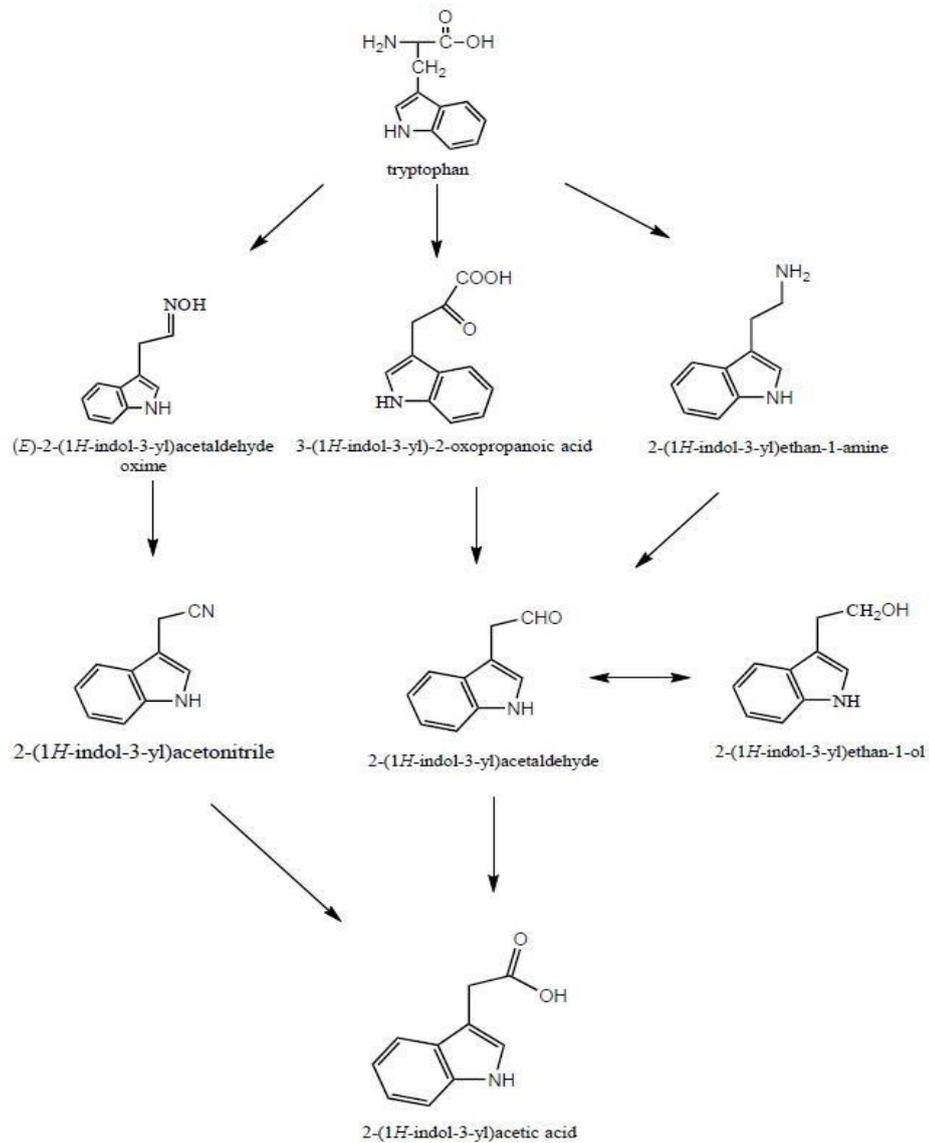


Figura 1 Síntesis de triptófano en Acido indol-3-acético

1.4.2.2 Giberelinas

Las giberelinas al igual que las auxinas promueve el crecimiento del tallo y el desarrollo del ciclo de la planta, alargamiento de segmentos nodales, participan en procesos de iniciación floral fue descubierta por japoneses, que estudiaban una enfermedad en el arroz.

1.4.2.3 Citoquininas

Es una de las fitohormonas más importantes dentro del grupo ya que estas son de vital importancia en la estimulación y crecimiento de raíces, el crecimiento de frutos y estimulan la movilización de nutrientes, se sintetizan a partir de la Adenina(Alcantara Cortes et al., 2019; Córdova Ruiz, 2019)

Actualmente el termino reguladoras de crecimiento hace referencia a sustancias de origen sintético y vegetal que dan respuestas a nivel metabólico o crecimiento de la planta ya que siguen una dinámica de regulación intrínseca, como se observar en la figura 3 y algunos de estos reguladores son adquiridos desde suelo, (Gallardo, 2008; Tanimoto, 2007), en la industria existe diferentes productos que mejoran el desarrollo de los cultivos que son a base de algas marinas(Ricardo et al., 2020).

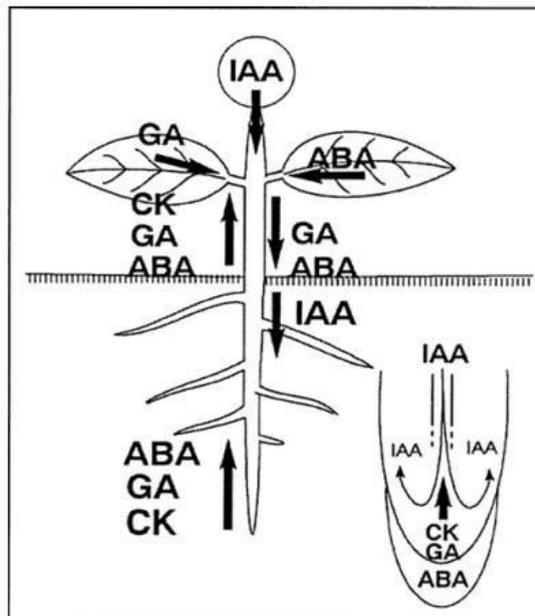


Figura 2 Movimiento de reguladores de crecimiento(Tanimoto, 2007)

1.4.3 *Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen

A. spicifera es un alga roja ampliamente distribuida en mares subtropicales y tropicales y se encuentra en muchos hábitats intermareales y submareales. Está distribuida desde los arrecifes poco profundos hasta profundidades de hasta 17m reportado en Puerto Rico y 22m en las Islas Vírgenes (Ceramiáles, 1999), esta macroalga se la considera como una especie invasora en las islas del Pacífico

central y en lugares como Hawaii es la principal invasora(CONABIO, 2017), esto se debe a su estrategia reproductiva sexual como asexual, la capacidad de regenerarse por fragmentación y que se adapta fácilmente a diversas condiciones ambientales por lo que representa una amenaza para su nuevo ecosistema (Budiyanto et al., 2022; Schnöller, 2016)

A lo largo de diversos estudios se ha encontrados que posee diversas propiedades en como bioindicador de enriquecimiento de nutrientes, también se ha documentado que es un buen productor de oxígenos y como materia prima para la producción de biocombustible por su alto contenido en lignina(CONABIO, 2017). Desde 1986 se ha recopilado datos sobre los metabolitos secundarios que posee la *A. spicifera* y el uso como antitumoral, antibacterial, antiinflamatorio y antioxidante.(Budiyanto et al., 2022)



Figura 3 *Acanthophora spicifera* (M.Vahl) Børgesen

Fuente: Natusfera

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos propuestos se presenta un esquema de trabajo y metodología a desarrollar (ilustración 1) en el laboratorio de Bioproductos y Bioprocesos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

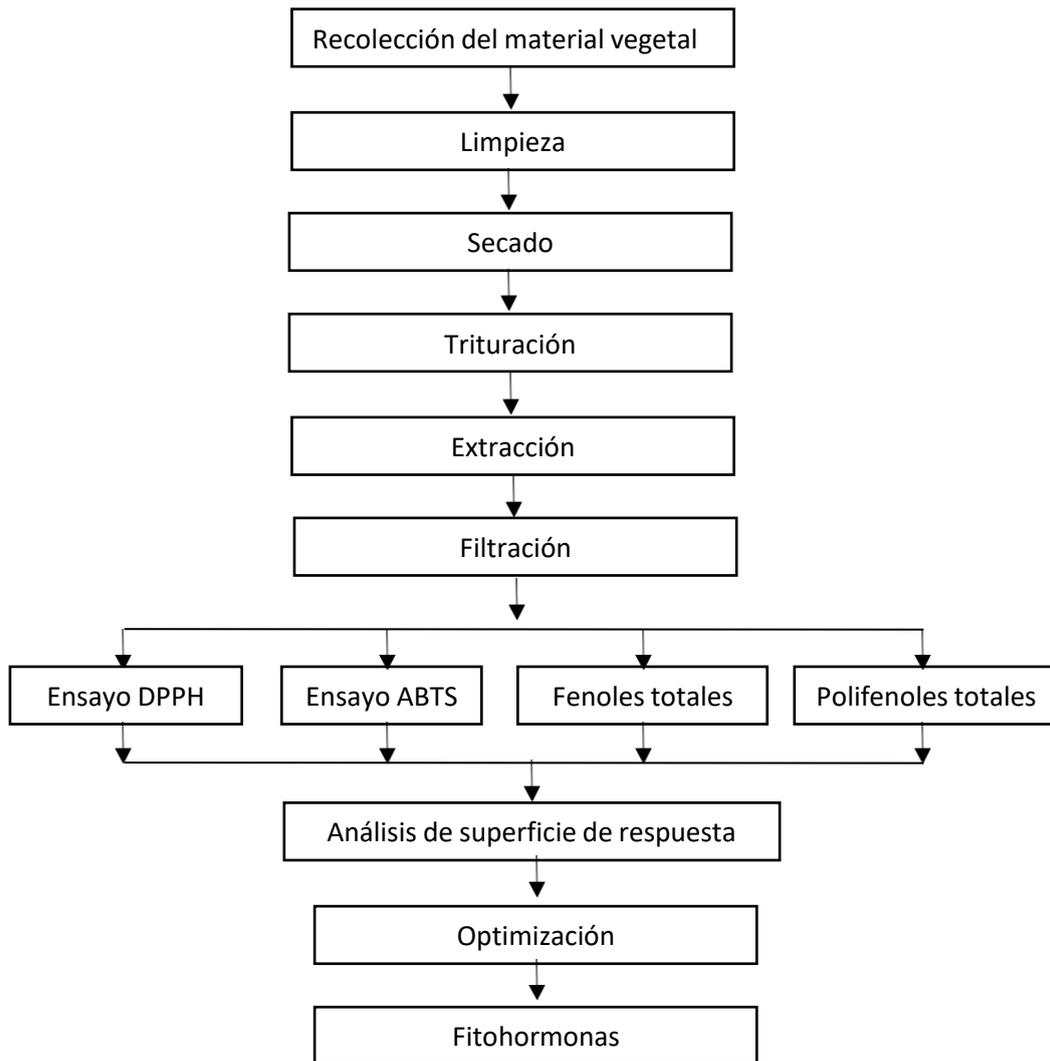


Ilustración 1 Esquema de trabajo para la determinación de la composición bioquímica del alga roja *Acanthophora spicifera*.

2.1 Diseño estadístico de experimento

Para el análisis estadístico de los diferentes ensayos se definió un ANOVA multinivel con las variables independientes: tipo de secado (X_1), concentración de Etanol (X_2), tipo de extracción (X_3), temperatura (X_4) y tiempo (X_5), mientras que las variables de dependientes fueron: actividad captadora de radicales DPPH (Y_1), actividad inhibidora del radical catiónico ABTS (Y_2), contenido de fenoles totales (Y_3) y contenido de flavonoides totales (Y_4). Los niveles experimentales fueron: para tipo de secado: Liofilizado y bandeja, en concentración de Etano: 50%, 70% para el tipo de extracción: digestión y sonicación, para temperatura: 40°C, 45°C y 50°C, para tiempo de extracción: 30 min, 40 min y 50 min.

2.2 Recolección y preparación de materia prima

La recolección del material vegetal se realizó en la playa de San Pedro de Manglaralto (1°57'42.7"S 80°44'05.2"W), de la provincia de Santa Elena durante el mes de enero del 2021, la identificación taxonómica fue confirmada por la especialista en macroalgas de CENAIM Sofie Van Den Hende, Ph.D. Las muestras fueron colectadas en bolsas de polietileno estéril con cierre hermético previamente rotuladas, posteriormente fueron limpiadas de epifitas y materiales extraños y guardadas en refrigeración.

2.3 Análisis de los métodos de secado

Para el proceso de secado se utilizó un secador de bandeja con una temperatura de bulbo seco a 45 °C, las condiciones de velocidad y humedad relativa del aire se mantuvieron constantes, para el proceso de secado por liofilización a una temperatura de -40 °C, en ambos procesos se obtuvo los datos pesando periódicamente las muestras en intervalos de tiempo hasta tener un valor constante. Para conocer la humedad (X), %humedad (% X) y rendimiento (% R) de las muestras fueron calculadas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$X = \frac{p_H - p_S}{p_S} \quad [1]$$

$$\%X = \frac{p_H - p_S}{p_H} \times 100\% \quad [2]$$

$$\%R = \frac{p_S}{p_H} \times 100\% \quad [3]$$

Donde p_H es el peso de la muestra húmeda y p_S es el peso de muestra de seca.

2.4 Obtención de extractos

Para la obtención de extractos se colocó la muestra seca y etanol en una relación 1:15, se realizó por el método de digestión y de sonicación respectivamente, sellando el recipiente con papel aluminio para evitar pérdida del disolvente, finalmente los extractos fueron filtrados en papel Whatman N°1 y preservados a -4°C para su posterior análisis espectrofotométricos

2.5 Ensayos de actividad antioxidante

La actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos se evaluó en el espectrofotómetro por medio de los ensayos DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) y ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico)

2.5.1 Ensayo DPPH

El ensayo DPPH se realizó tomando como referencia la metodología descrita por Viteri *et al.*, 2021 (Viteri et al., 2021). Se hizo reaccionar 50 μL de muestra (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con 150 μL de una solución metanólica de DPPH 0.15 mM Sigma-Aldrich y después de 30 minutos de incubación en oscuridad se midió la absorbancia a 517 nm usando un Lector multi-modal Synergy HTX con detector UV-VIS (Biotek). El porcentaje de actividad captadora de radicales DPPH fue calculado de acuerdo a la ecuación 4:

$$\text{Actividad captadora de DPPH (\%)} = \left[1 - \frac{Abs_{muestra}}{Abs_{control}}\right] \times 100 \quad [4]$$

2.5.2 Ensayo ABTS

El ensayo ABTS se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Viteri *et al.*, 2021 (Viteri et al., 2021). Se preparó una solución stock del radical catiónico (ABTS^+) mediante reacción de 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) Sigma-Aldrich y persulfato de potasio (Sigma-Aldrich). La solución stock se refrigeró a 4°C en oscuridad durante 18 horas. Finalmente, 50 μL de muestra (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se hicieron reaccionar con 150 μL de la solución

stock en una placa de 96 pocillos y se incubo durante 30 min y se midió la absorbancia en una longitud de onda de 732 nm en un espectrofotómetro UV-160A (Shimadzu). El porcentaje de actividad inhibidora del radical catiónico ABTS fue calculado de acuerdo a la ecuación 5:

$$\text{Actividad inhibidora de ABTS}^+ (\%) = \left[1 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}}\right] \times 100 \quad [5]$$

Las mediciones de los extractos etanólicos evaluados se compararon también con una curva de calibración preparada con soluciones del antioxidante Trolox (Ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) Sigma y los resultados de la actividad antioxidante fueron expresados como μmol equivalentes de Trolox por gramo de extracto seco. Se utilizaron concentraciones de Trolox entre (10 - 200 $\mu\text{mol/L}$) para el ensayo DPPH y el ensayo ABTS (Anexos 2).

2.6 Determinación de fenoles y flavonoides totales

2.6.1 Contenido de fenoles totales

Para determinar el contenido fenólico total se empleó el método colorimétrico Folin-Ciocalteu empleado por Zhong *et al.*, 2020 (Zhong *et al.*, 2020). Se agregó 25 μL de muestra, 25 μL de solución folin al 25% (v/v) y 200 μL de agua destilada en los pocillos de una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 5 min a 25°C. Posteriormente se agregó 25 μL de carbonato de sodio al 10% (p/p) y dejando incubar durante 1 hora a 25°C. La absorbancia se midió a 765 nm en un espectrofotómetro UV-160A (Shimadzu). En la curva de calibración se utilizó un estándar de ácido gálico (10 - 200 $\mu\text{mol/L}$) y los resultados se presentaron en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de extracto seco.

2.6.2 Contenido flavonoides totales

La estimación de flavonoides totales se realizó utilizando el método colorimétrico del cloruro de aluminio como lo describe Avramova *et al.*, 2017 (Avramova *et al.*, 2017). En cada pocillo de una placa de 96 pocillos se reaccionó 20 μL de muestra

y 200 µL de una mezcla de reactivos en donde se utilizó 60 µL de etanol, 10 µL de cloruro de aluminio al 10% (w/v), 10 µL de acetato de potasio al 1M y 120 µL de agua destilada, luego se incubo a temperatura ambiente durante 30 min para su posterior lectura a una absorbancia de 415 nm usando un Lector multi-modal Synergy HTX con detector UV-VIS (Biotek). La medición se comparó con una curva de calibración preparada con soluciones de catequina (Sigma-Aldrich) y el resultado se expresó en mg equivalentes de catequina (CE) por gramo de extracto seco(Chang et al., 2002).

2.7 Fitohormonas

Para la extracción de fitohormonas se colocó la muestra seca y etanol al 50% en una relación 1:15 (Díaz Sisalema, n.d.) mediante la extracción por digestión a la temperatura y tiempo obtenidos de la optimización de antioxidantes, finalizado el tiempo de extracción, se procedió a filtrar en papel Whatman N°1 y envasado para su posterior uso.

2.7.1 Purificación del extracto concentrado

Para la purificación del extracto se utilizó el método descrito por Prasad *et al.* 2010, el extracto se concentró mediante la evaporación del disolvente en un destilador rotatorio o rotaevaporador a 200 rpm y a 60 °C y se resuspendió con metanol en un tubo eppendorf y rotaevaporado nuevamente, posteriormente se resuspendio con 400 µl de agua acidificada con un pH 3 y con 1.2 mL de acetato de etilo, luego se llevó a un agitador rotatorio por 1 hora a 1200 rpm y 15°C. Se procedió a separar la fase liquida de la oleoso y se la evaporó a temperatura ambiente para posteriormente resuspender con metanol.(Prasad et al., 2010) para su análisis.

2.7.2 Detección y cuantificación de auxinas

Para detectar y cuantificar auxinas se utilizó el reactivo de Salkowsky, el cual permite detectar la presencia de compuestos indol mediante una coloración rosa (Gang et al., 2019), debido a la formación del complejo AIA y la reducción de Fe³⁺, Para la elaboración el reactivo se utilizó la metodología descrita por Shraddha *et al.* 2019(Díaz Sisalema, n.d.; Gang et al., 2019).

Al extracto purificado se le agregó el reactivo Salkowsky en una relación 2:15(Lara et al., 2011) respectivamente, incubando en condiciones de oscuridad durante 30 minutos para su posterior lectura a una absorbancia de 540 nm usando un espectrofotómetro UV-160A (Shimadzu), se compararon los resultados con la curva de calibración preparada con AIA y el resultado se expresó en ppm de auxinas.

2.8 Análisis estadísticos

Las diferencias significativas entre los tratamientos fueron determinados estadísticamente utilizado, un análisis de desviación estándar y un análisis de matriz de dispersión para tipo de secado (X_1), concentración de Etanol (X_2), tipo de extracción (X_3), con estas nuevas condiciones se realizó el análisis de superficie de respuesta analizando el efecto de las variables de temperatura (X_4) y tiempo (X_5) de extracción sobre las variables de la actividad captadora de radicales DPPH (Y1), la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS (Y2), de los y el contenido de fenoles totales (Y3), el contenido de flavonoides totales (Y4) respectivamente para todo el proceso estadístico se emplearon los softwares estadísticos Rstudio e InfoStat obteniendo el los modelos matemáticos, gráficas y la verificación de los valores óptimos.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de los métodos de secado

En el secado de horno de bandeja, el contenido de humedad fue de 93.60% y el rendimiento de muestra seca el 6.21% y en el secado por liofilización el contenido de humedad fue del 81.69% y el rendimiento 17.11%. El mayor rendimiento observado en la muestra seca se debe a que es con aire frío (Anexo 1).

3.2 Análisis de variables de extracción

Del análisis de varianza se obtiene que la mayor extracción fue por digestión con una concentración del 50% de etanol; con un análisis de la matriz de dispersión (Anexo 3) para cada variable dependiente, DPPH, ABTS, Fenoles y Flavonoides totales, en relación con la temperatura y tiempo, se observó que los mejores resultados para la actividad antioxidante por DPPH y ABTS con un secado de horno de bandeja mientras que para la obtención de fenoles y flavonoides totales dio como mejor resultado con un secado por liofilización.

3.3 Análisis de superficie de respuesta para DPPH, ABTS, Fenoles y Flavonoides totales

Para análisis de superficie de respuesta se utilizaron los valores descritos en las siguientes tablas que se presentan a continuación:

Tabla 1 Datos de extracción a temperatura y tiempo para DPPH y ABTS

Temperatura (X ₄)	Tiempo (X ₅)	DPPH	ABTS
°C	min	μmol TE/g ps	μmol TE/g ps
40	30	1.941±0.273	11.095±0.174
40	40	2.201±0.414	12.915±0.388
40	50	2.522±0.930	10.792±0.114
45	30	2.964±0.192	14.062±0.031
45	40	3.153±0.091	13.968±0.121
45	50	2.841±0.611	14.032±0.042

50	30	2.531±0.911	14.023±0.004
50	40	3.091±0.074	13.725±0.004
50	50	3.682±0.021	13.692±0.177

TE, equivalente Trolox; p.s, peso seco

Tabla 2 Datos de extracción a temperatura y tiempo para Fenoles y Flavonoides totales

Temperatura	Tiempo	Fenoles totales	Flavonoides totales
°C	min	mg GAE/g ps	ug QE/g ps
40	30	0.699±0.031	391.917±0.001
40	40	0.941±0.006	545.667±0.589
40	50	0.360±0.009	159.417±0.001
45	30	0.373±0.035	187.750±2.357
45	40	0.414±0.003	293.583±2.357
45	50	0.406±0.001	261.500±0.589
50	30	0.912±0.091	1281.082±3.536
50	40	0.903±0.001	1255.667±2.946
50	50	0.615±0.356	1210.667±2.946

GAE, ácido gálico; CE, catequina; p.s, peso seco

3.3.2 Análisis de la actividad captadora de radicales libres DPPH

El análisis de superficie de respuesta se ha obtenido de los datos experimentales de la tabla 1 donde el análisis con la matriz de dispersión indica que el tiempo y temperatura de extracción tuvieron un efecto cuadrático sobre la actividad captadora de radicales DPPH y su influencia la vemos reflejada en la ecuación [7]

$$Y_1 = -34.3818 + 1.4821X_4 + 0.1038X_5 - 0.0159X_4^2 - 0.00141X_5^2 +$$

$$0.00064X_4X_5$$

[7]

Superficie de respuesta para DPPH

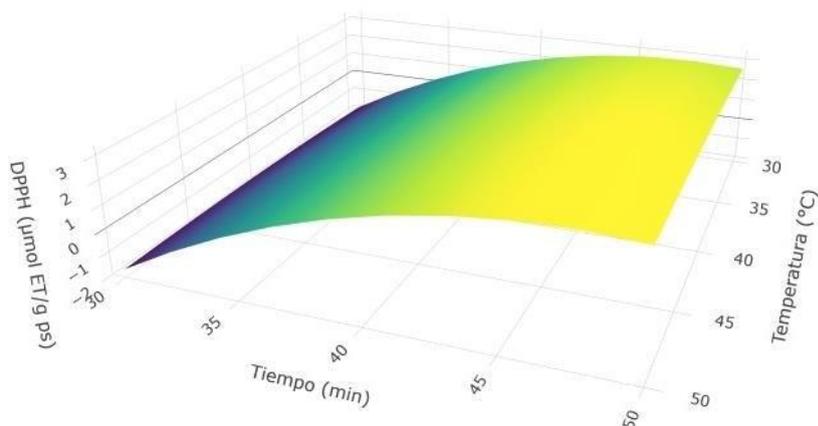


Gráfico 1 Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad captadora de radicales DPPH

3.3.2 Análisis de la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS

El análisis de superficie de respuesta obtenido de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 1, demostró que los parámetros de extracción ejercieron un efecto cuadrático sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS. El efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS se muestra en la ecuación [8] a continuación:

$$Y_2 = -1.1114e^2 + 4.9559X_4 + 4.6452e^{-1}X_5 - 5.2545e^{-2}X_4^2 - 5.8668e^{-3}X_5^2 - 1.3868e^{-4}X_4X_5 \quad [8]$$

Superficie de respuesta para ABTS

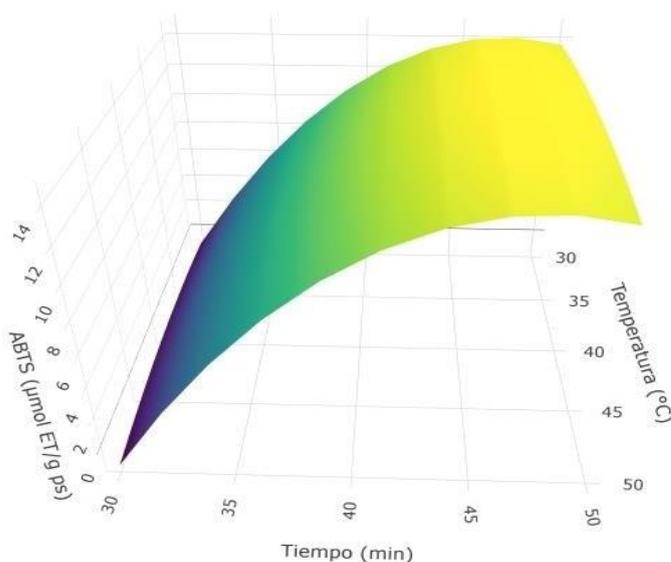


Gráfico 2 Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS.

3.3.3 Análisis del contenido de fenoles totales

El análisis de superficie de respuesta obtenido de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 2, demostró que los parámetros de extracción ejercieron un efecto cuadrático sobre el contenido de fenoles totales. El efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales se muestra en la ecuación [9] a continuación:

$$Y_3 = 25.18 - 1.2203X_4 + 0.13414X_5 + 0.01362X_4^2 - 0.00191X_5^2 + 0.00021X_4X_5 \quad [9]$$

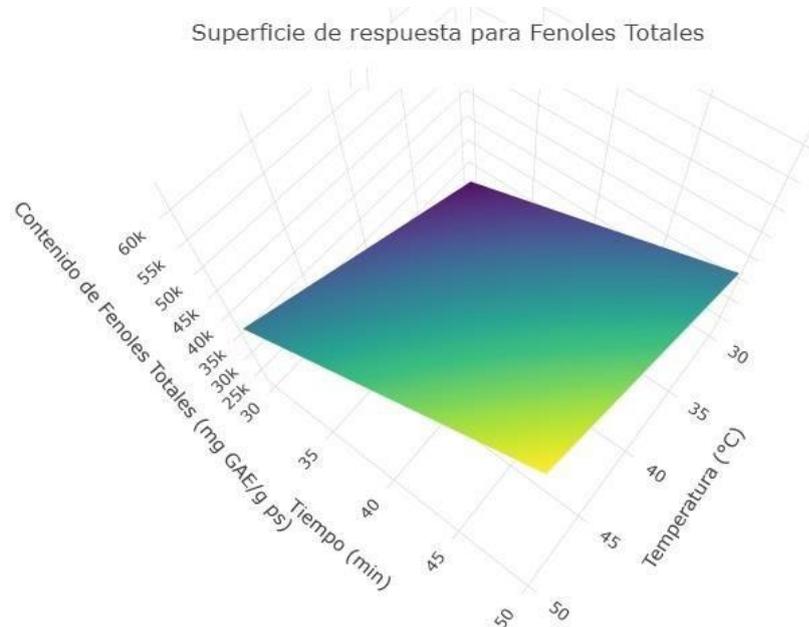


Gráfico 3 Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales

3.3.4 Análisis del contenido de flavonoides totales

El análisis de superficie de respuesta obtenido de los datos experimentales que se muestran en la Tabla 2, demostró que los parámetros de extracción ejercieron un efecto cuadrático sobre el contenido de flavonoides totales. El efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de fenoles totales se muestra en la ecuación [10] a continuación:

$$Y_4 = 41444.13 - 1959.31X_4 + 52.7118X_5 + 22.3916X_4^2 - 1.1625X_5^2 + 0.8104X_4X_5 \quad [10]$$

Superficie de respuesta para Flavonoides Totales

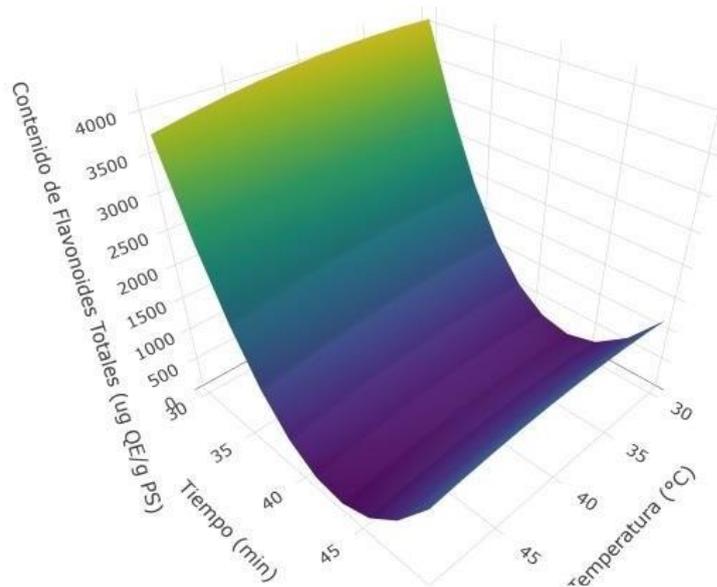


Gráfico 4 Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre el contenido de flavonoides totales

Con las ecuaciones obtenidas del análisis de superficie de respuesta se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción a 47 °C y 47 minutos para la actividad captadora de radicales libres DPPH, para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS 47 °C y 39 minutos, para fenoles totales 45 °C y 37 minutos y en flavonoides totales 43 °C y 38 minutos.

Los resultados obtenidos al compararlo con otros estudios con diferentes métodos de extracción con la misma alga *A. spicifera* podemos observar que existe una diferencia entre el alga que crece en Ecuador con la que crece en la India en el caso del % DPPH se obtuvo un 19.29 ± 0.011 en comparación con 6.91 ± 0.42 que tiene un proceso de extracción por maceración por 24 h con metanol al 98% (Ganesan et al., 2008). En cuanto a fenoles totales se extrajo 60.24 ± 0.129 µg GAE /mL mientras que en estudio de Murugan *et al.* 2014 nos indica que obtuvo 0.87 ± 0.10 µg GAE /mL con una extracción con metanol al 98% y $0.24 \pm 0,08$ µg/mL GAE con una extracción con agua, así mismo se reporta que obtuvieron 25.7 ± 0.6 µg QE /mL en extracción con metanol al 98% mientras que en la extracción con agua reportaron $8,5 \pm 0,4$ µg QE /mL en la extracción de flavonoides

totales(Murugan & Iyer, 2014), comparado con la extracción que se realizó con etanol al 50% que fue de $85.41 \pm 3.53 \mu\text{g QE /mL}$.

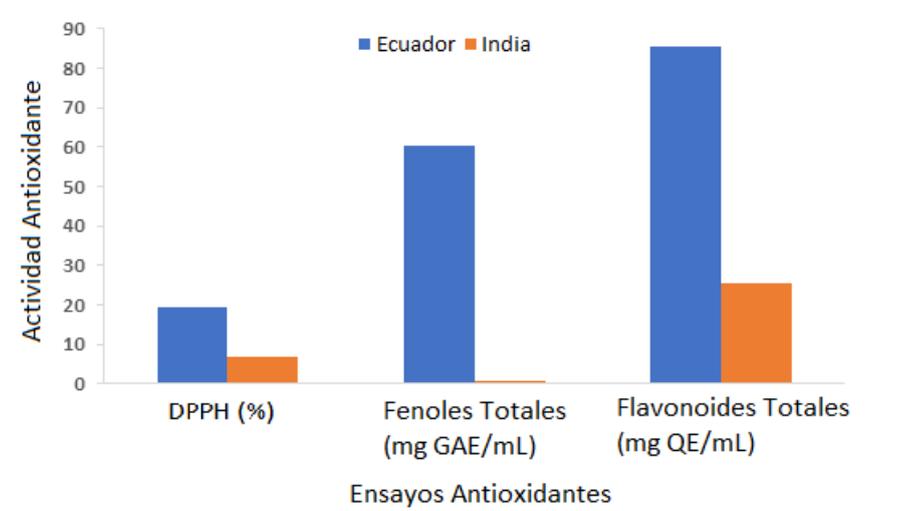


Gráfico 5 Resultado comparativo del alga *Acanthophora spicifera* de Ecuador e India

3.4 Detección de auxinas por el método de Salkowsky

En la extracción de auxinas se utilizó el tiempo y temperatura óptimas de los ensayos de antioxidantes (DPPH, ABTS, fenoles y flavonoides totales) previos, teniendo un mejor resultado en tiempo y temperatura óptimas para DPPH donde se obtuvo una concentración de auxinas de 0.287 ppm en 10 gramos de muestra seca teniendo en cuenta de que el largo promedio de la muestra fue de 50 mm, el resultado obtenido es concordante con lo descrito por Fu *et al*, 2011 que indica una baja concentración de fitohormonas en muestra vegetal(Fu et al., 2011) por lo que no se tiene un registro de valor mínimo, al igual que Bai *et al*, 2010 indica que existen otras sustancias en mayor cantidad que pueden ser de interferencia, siendo los metabolitos primarios: proteínas o clorofila y los secundarios: fenoles y flavonoides(Bai et al., 2010), también se debe de tener en cuenta la dinámica de los reguladores de crecimiento en su obtención(Tanimoto, 2007).

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El secado por liofilización presentó un mayor rendimiento de muestra seca en comparación con el secado de horno de bandeja.

Con el análisis de superficie de respuesta se obtuvo las condiciones de temperatura y tiempo óptimo de extracción a 47 °C y 47 minutos para la actividad captadora de radicales libres DPPH, para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS 47 °C y 39 minutos, para fenoles totales 45 °C y 37 minutos y en flavonoides totales 43 °C y 38 minutos en los extractos etanólicos al 50%

La *Acanthophora spicifera* que crece en Ecuador, se extrajo una mayor cantidad de fenoles y flavonoides ($60.24 \pm 0.129 \mu\text{g GAE /mL}$ y $85.41 \pm 3.53 \mu\text{g QE /mL}$) en comparación con la que crece en India ($0.87 \pm 0.10 \mu\text{g GAE /mL}$ y $25.7 \pm 0.6 \mu\text{g QE /mL}$)

Las auxinas en la naturaleza se encuentran en bajas concentraciones, en el caso de la *A. spicifera* en el extracto optimizado para DPPH se obtuvo una mayor cantidad de auxinas 0.287 ppm en 10gr de muestra seca teniendo en cuenta el tamaño promedio del alga,

Detectar la presencia de antioxidantes que se degradan o pierden por la concentración del solvente

Además, se deben explorar nuevas aplicaciones potenciales de estos compuestos en campos como la medicina y la agricultura.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcantara Cortes, J., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. D., & Sánchez Mora, R. M. (2019). *Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal*. 17, 109–129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Avramova, V., Abdelgawad, H., Vasileva, I., Petrova, A. S., Holek, A., Mariën, J., Asard, H., & Beemster, G. T. S. (2017). High antioxidant activity facilitates maintenance of cell division in leaves of drought tolerant maize hybrids. *Frontiers in Plant Science*, 8(FEBRUARY), 84. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2017.00084/BIBTEX>
- Badmus, U. O., Taggart, M. A., & Boyd, K. G. (2019). The effect of different drying methods on certain nutritionally important chemical constituents in edible brown seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, 31(6), 3883–3897. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01846-1>
- Bai, Y., Fuyou, D., & Liu, H. (2010). *Determination strategies of phytohormones: Recent advances*. <https://doi.org/10.1039/C0AY00471E>
- Bandaranayake, W. M. (2002). Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. In *Wetlands Ecology and Management* (Vol. 10).
- Batista González, A. E., Charles, M. B., Mancini-Filho Ii, J., Vidal, A., & Iii, N. (2009). Las algas marinas como fuentes de fitofármacos antioxidantes Seaweeds as sources of antioxidant phytomedicines. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2). <http://scielo.sld.cu>
- Bedon Romero, N. (2011). *Aplicación De Fitohormonas En El Cultivo De Brocoli*. <https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/2190/1/T-UTEQ-0230.pdf>
- Budiyanto, F., Ghandourah, M. A., Bawakid, N. O., Alorfi, H. S., Abdel-Lateff, A., & Alarif, W. M. (2022). Threat and gain: The metabolites of the red algae genus *Acanthophora*. *Algal Research*, 65, 102751. <https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2022.102751>
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>
- Ceramiales, R. (1999). *A taxonomic , of species relationships Acanthophora study phylogenetic general and biogeographical biogeographical phologically distinguishable species , Jong Rhodophyta) , phylogenetic biogeographical analysis , monophyletic algae (Falkenberg ,. 44, 217–249.*
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., & Chern, J.-C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182. https://scholar.google.com/scholar_lookup?author=C.+C.+Chang&author=M.+H.+Yang&author=H.+M.+Wen&author=J.+C.+Chern+&publication_year=2002&title=Esti

mation+of+total+flavonoid+content+in+propolis+by+two+complementary+colorimetric+methods&journal=J.+Food+Drug+Anal.&volume=10&pages=178-182

- Chen, J., Li, M., Yang, R., Luo, Q., Xu, J., & Ye, Y. (2015). *Profiling lipidome changes of Pyropia haitanensis in short-term response to high-temperature stress*.
<https://doi.org/10.1007/s10811-015-0733-z>
- Chenlo, F., Arufe, S., Díaz, D., Torres, M. D., Sineiro, J., & Moreira, R. (2018). Air-drying and rehydration characteristics of the brown seaweeds, *Ascophyllum nodosum* and *Undaria pinnatifida*. *Journal of Applied Phycology*, 30(2), 1259–1270.
<https://doi.org/10.1007/s10811-017-1300-6>
- CONABIO. (2017). Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México.
https://enciclovida.mx/pdfs/exoticas_invasoras/Acanthophora%20spicifera.pdf
- Córdova Ruiz, R. (2019). Aplicación De Extractos Vegetales En La Propagación Asexual De Estacas De Valeriana (*Valeriana* sp).
- DA, P.-M., AMO, S., AE, B.-G., D, D.-G., ER, de A.-W., & JR, P. (2018). Protective effects against FeCl₃-Induced oxidative stress in Vero cells related to the polyphenol content of the hydrophilic fractions from *Halimeda* spp. seaweed. *Rev Cub Cienc Biol*, 6, 1–8.
- De, P., De, G., Marinos, R., & Medioambiente, Y. (2014). Adaptaciones morfológicas y crecimiento de *Grateloupia dichotoma* e *Hypnea spinella* (Rhodophyta) bajo condiciones de cultivo intensivo Trabajo Para La Obtención De La Suficiencia Investigadora.
- Díaz Sisalema, Á. (n.d.). Evaluación de la actividad fitorreguladora de auxinas obtenidas a partir de un extracto de tallos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de plantas in vitro.
- Fan, G. J., Byung Hoon Han, Kang, Y. H., & Man Ki Park. (2001). Evaluation of inhibitory potentials of chinese medicinal plants on platelet-activating factor (PAF) receptor binding. *Natural Product Sciences*, 7(2), 33–37.
- Fu, J., Xiaohong, S., Wang, J., Jinfang, C., & Cunyu, Y. (2011). Progress in quantitative analysis of plant hormones. *Chinese Sci Bull*, 56(4), 355–366.
<https://doi.org/10.1007/s11434-010-4243-8>
- Gallardo, I. (2008). Estandarización De Métodos De Detección Para Promotores De Crecimiento Vegetal (Ácido Indol Acético Y Giberelinas) En Cultivos Microbianos [Pontificia Universidad Javeriana].
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8948/tesis95.pdf>
- Ganesan, P., Kumar, C. S., & Bhaskar, N. (2008). Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99(8), 2717–2723.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2007.07.005>

- Gang, S., Sharma, S., Saraf, M., Buck, M., & Schumacher, J. (2019). Analysis of Indole-3-acetic Acid (IAA) Production in Klebsiella by LC-MS/MS and the Salkowski Method. *Bio-Protocol*, 9(9). <https://doi.org/10.21769/BIOPROTOCOL.3230>
- Gómez-Ordóñez, E. (2013). Evaluación nutricional y propiedades biológicas de algas marinas comestibles. Estudios in vitro e in vivo. *Tesis Doctoral*, 238. <http://eprints.ucm.es/20162/>
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(4), 600–609. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2011.07.004>
- Gupta, S., Cox, S., & Abu-Ghannam, N. (2011). Effect of Different Drying Temperatures on the Moisture and Phytochemical Constituents of Edible Irish Brown Seaweed Recommended Citation Effect of different drying temperatures on the moisture and phytochemical constituents of edible Irish brown seaweed. *LWT-Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.022>
- Gutierrez, D. D., Ortega, W. M., de Oliveira E Silva, A. M., Muñoz, C. Z., Mancini-Filho, J., & Novoa, A. V. (2015). Comparación de las propiedades antioxidantes y contenido de polifenoles de extractos acuosos de las algas marinas Bryothamnion triquetrum y Halimeda opuntia. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 56(2), 89–99. <https://doi.org/10.4321/S2340-98942015000200003>
- Humphrey, A. M. (2006). Chlorophyll as a Color and Functional Ingredient. *Journal of Food Science*, 69(5), C422–C425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x>
- Ito, K., & Hori, K. (1989). Seaweed: Chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International*, 5(1), 101–144. <https://doi.org/10.1080/87559128909540845>
- Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R., & Saura-Calixto, F. (2001). Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(5), 530–534. <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>
- Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2015). Processing of seaweeds. In *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications* (pp. 61–78). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418697-2.00004-0>
- Kathiresan, K., Nabeel, M. A., & Manivannan, S. (2008). Bioprospecting of marine organisms for novel bioactive compounds. *Scientific Transactions in Environment and Technovation*, 1(3), 107–120. <https://doi.org/10.20894/stet.116.001.003.001>
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2009). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some asian vegetables. *Acta Horticulturae*, 818, 241–248. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.818.35>
- Lara, C., Oviedo, L., & Alemán, A. (2011). Aislados nativos con potencial en la producción de ácido indol acético para mejorar la agricultura. *Biotecnología En El*

Sector Agropecuario y Agroindustrial, 9, 17–23.
<http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n1/v9n1a03.pdf>

- le Lann, K., Jégou, C., & Stiger-Pouvreau, V. (2008). Effect of different conditioning treatments on total phenolic content and antioxidant activities in two Sargassacean species: Comparison of the frondose *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and the cylindrical *Bifurcaria bifurcata* R. Ross. *Phycological Research*, 56(4), 238–245. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1835.2008.00505.x>
- Ling, A. L. M., Yasir, S., Matanjun, P., & Abu Bakar, M. F. (2015). Effect of different drying techniques on the phytochemical content and antioxidant activity of *Kappaphycus alvarezii*. *Journal of Applied Phycology*, 27(4), 1717–1723. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0467-3>
- Medina Huaman, Y. (2016). *Evaluación De Sustancias Endógenas Promotoras Del Enraizamiento Presentes En Salix Chilensis Molina Mediante Bioensayos En Vigna radiata (L.) R. Wilczek y Rubus ulmifolius Schott.*
- Murugan, K., & Iyer, V. V. (2014). Antioxidant and antiproliferative activities of extracts of selected red and brown seaweeds from the Mandapam Coast of Tamil Nadu. *Journal of Food Biochemistry*, 38(1), 92–101. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12029>
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 3, Issue 4, pp. 255–266). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Pesca, I. N. de. (1994). Internacional Bio Power Corporation Algas Marinas de las costas de la Republica del Ecuador. *Botánica Marina.*, 156.
http://www.ibpcorp.biz/documentos/IBPCORP_Libro Algas_definitivo.pdf
- Prasad, K., Das, A. K., Oza, M. D., Brahmabhatt, H., Siddhanta, A. K., Meena, R., Eswaran, K., Rajyaguru, M. R., & Ghosh, P. K. (2010). Detection and quantification of some plant growth regulators in a seaweed-based foliar spray employing a mass spectrometric technique sans chromatographic separation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4594–4601. <https://doi.org/10.1021/jf904500e>
- Quitral R., V., Morales G., C., Sepúlveda L., M., & Schwartz M., M. (2012). Propiedades nutritivas y saludables de algas marinas y su potencialidad como ingrediente funcional. In *Revista Chilena de Nutricion* (Vol. 39, Issue 4, pp. 196–202). Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400014>
- Ricardo, B.-V., Alberto, J.-O., Leonel, A.-H., Del, D., Resumen, A., & De, D. (2020). Las fitohormonas una pieza clave en el desarrollo de la agricultura The plant hormones, an important component of the agriculture development Editado por: Selva Andina Research Society. *Journal of the Selva Andina Biosphere* ®. Bolivia. All Rights Reserved.

- Rioux, L. E., Beaulieu, L., & Turgeon, S. L. (2017). Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food Hydrocolloids*, 68, 255–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.005>
- Rizvi, M. A., & Shameel, M. (2004). Studies on the bioactivity and elementology of marine algae from the coast of Karachi, Pakistan. *Phytotherapy Research*, 18(11), 865–872. <https://doi.org/10.1002/ptr.1441>
- Russell, D. J. (1992). The ecological invasion of Hawaiian reefs by two marine red algae, *Acanthophora spicifera* (Vahl) Boerg. and *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. Ag., and their association with two native species, *Laurencia nidifica* J. Ag. and *Hypnea cervicornis* J. Ag. *ICES Mar. Sei. Symp*, 194, 110–125.
- Schnöller, V. C. G. (2016). *Caracterización química del alga roja Acanthophora spicifera (M. Vahl) Børgesen (Ceramiales: Rhodophyta) en La Bahía De La Paz, Baja California Sur, México*. 64.
- Smith, J. E., Hunter, C. L., & Smith, C. M. (2002). Distribution and Reproductive Characteristics of Nonindigenous and Invasive Marine Algae in the Hawaiian Islands. *Pacific Science*, 56(3), 299–315. <https://doi.org/10.1353/psc.2002.0030>
- Stramarkou, M., Papadaki, S., & Kyriakopoulou, K. (2017). *Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from Chlorella vulgaris*. <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1181-8>
- Tanimoto, E. (2007). Regulation of Root Growth by Plant Hormones—Roles for Auxin and Gibberellin. <https://doi.org/10.1080/07352680500196108>, 24(4), 249–265. <https://doi.org/10.1080/07352680500196108>
- Tsuda, R. T., Coles, S. L., Guinther, E. B., Andrew, R., Finlay, O., & Harriss, F. L. (2008). *Acanthophora spicifera* (Rhodophyta: Rhodomelaceae) in the Marshall Islands. In *Micronesica* (Vol. 40, Issue 2).
- Universidad Politecnica de Valencia. (n.d.). *Fitorreguladores*. Retrieved October 21, 2022, from http://www.euita.upv.es/varios/biologia/temas/tema_14.htm#Regulaci%C3%B3n%20del%20crecimiento%20y%20desarrollo:%20las%20hormonas%20vegetales%20o%20fitorreguladores
- Vaca Sandoya, A. M. (2018). *Biorremediación de agua contaminada con cadmio empleando la técnica de biosorción con tres especies de macroalgas*. http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/29594/1/TESIS_VACA_SANDOYA.pdf
- Valverde Velásquez, A. (2018). *Caracterización de la comunidad de tortugas marinas presentes en la zona costera del cantón La Libertad – Ecuador*. [Universidad Estatal Península De Santa Elena]. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4816/1/UPSE-TBM-2019-0008.pdf>
- Viteri, R., Giordano, A., Montenegro, G., & Zacconi, F. (2021). *Eucryphia cordifolia* extracts: Phytochemical screening, antibacterial and antioxidant activities.

<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960525>, 36(16), 4177–4181.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1960525>

- Wong, K., & Chikeung Cheung, P. (2001). Influence of drying treatment on three Sargassum species 2. Protein extractability, in vitro protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1023/A:1008188830177>
- Y, P., M, C., D, Y., G, Q., & Z, L. (2019). Research progress on the animal models of drug-induced liver injury: current status and further perspectives. *Biomed Res Int*, 1283824.
- Yoshie, Y., Wang, W., Hsieh, Y.-P., & Suzuki, T. (2002). Compositional Difference of Phenolic Compounds between Two Seaweeds, Halimeda spp. In *Journal of Tokyo University of Fisheries* (Vol. 88).
- Zhong, B., Robinson, N. A., Warner, R. D., Barrow, C. J., Dunshea, F. R., & Suleria, H. A. R. (2020). LC-ESI-QTOF-MS/MS Characterization of Seaweed Phenolics and Their Antioxidant Potential. *Marine Drugs*, 18(6).
<https://doi.org/10.3390/MD18060331>

ANEXOS 1

Tabla 3 Datos de contenido de humedad y rendimiento de secado por horno de bandeja

Muestras	masa Húmeda (g)	masa Seca (g)	masa de Agua (g)	Humedad (g H ₂ O/ g m.s)	% humedad	%Rendimiento
muestra 1	1,0155	0,0763	0,9391	12,3031	92,4829	7,5171
muestra 2	1,5064	0,0879	1,4185	16,1373	94,1648	5,8352
muestra 3	2,0258	0,1183	1,9075	16,1298	94,1622	5,8378
Promedio	1,5159	0,0942	1,4217	14,8567	93,6033	6,2119

Tabla 4 Datos de contenido de humedad y rendimiento de secado por liofilización

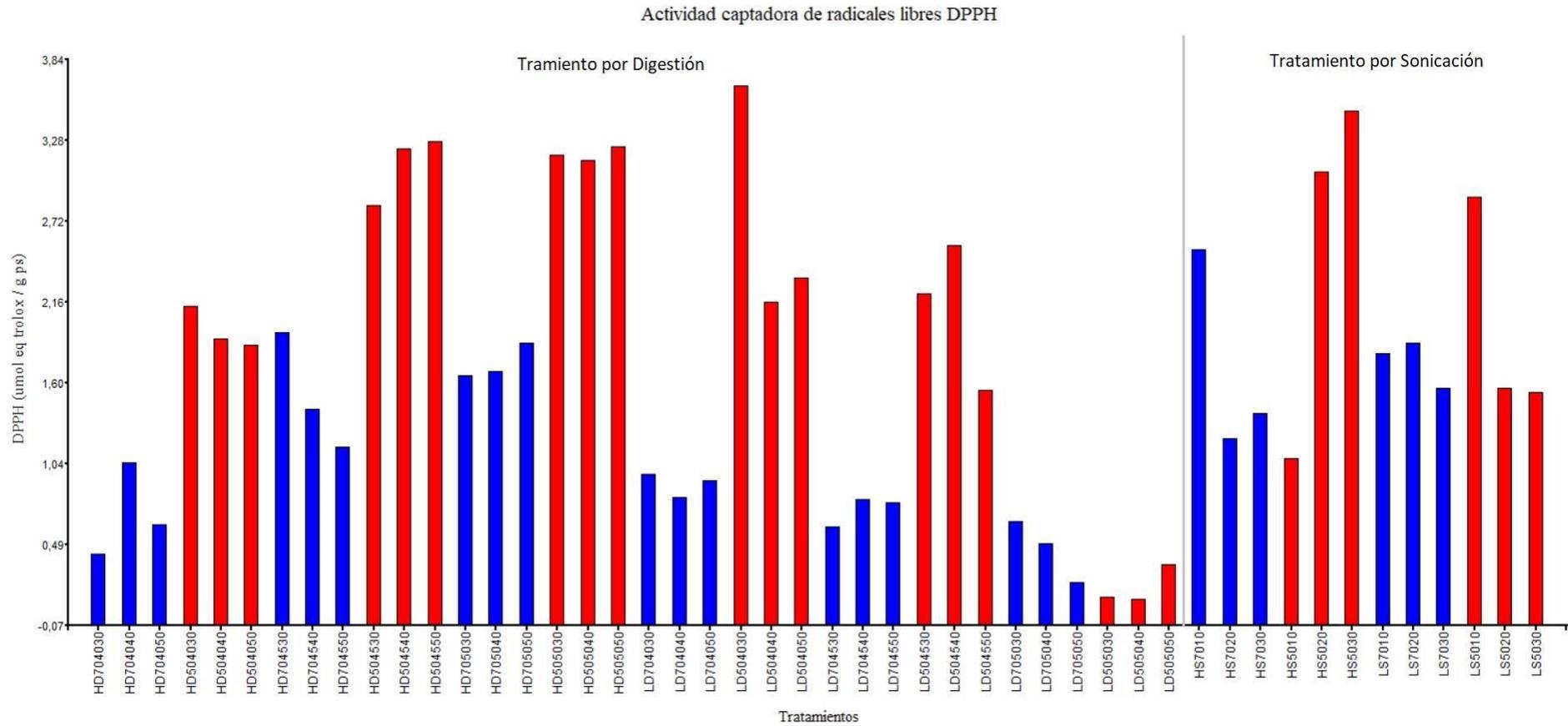
Promedio	masa Húmeda (g)	masa Seca (g)	masa de Agua (g)	Humedad (g H ₂ O / g m.s.)	%Humedad	%Rendimiento
muestra 1	1,0058	0,2448	0,7609	3,1080	75,6570	24,3430
muestra 2	1,5160	0,2569	1,2591	4,9010	83,0537	16,9463
muestra 3	2,0219	0,2759	1,7460	6,3287	86,3551	13,6449
Promedio	1,5145	0,2592	1,2553	4,7792	81,6886	17,1145

Tabla 5 Datos de extracción con Etanol

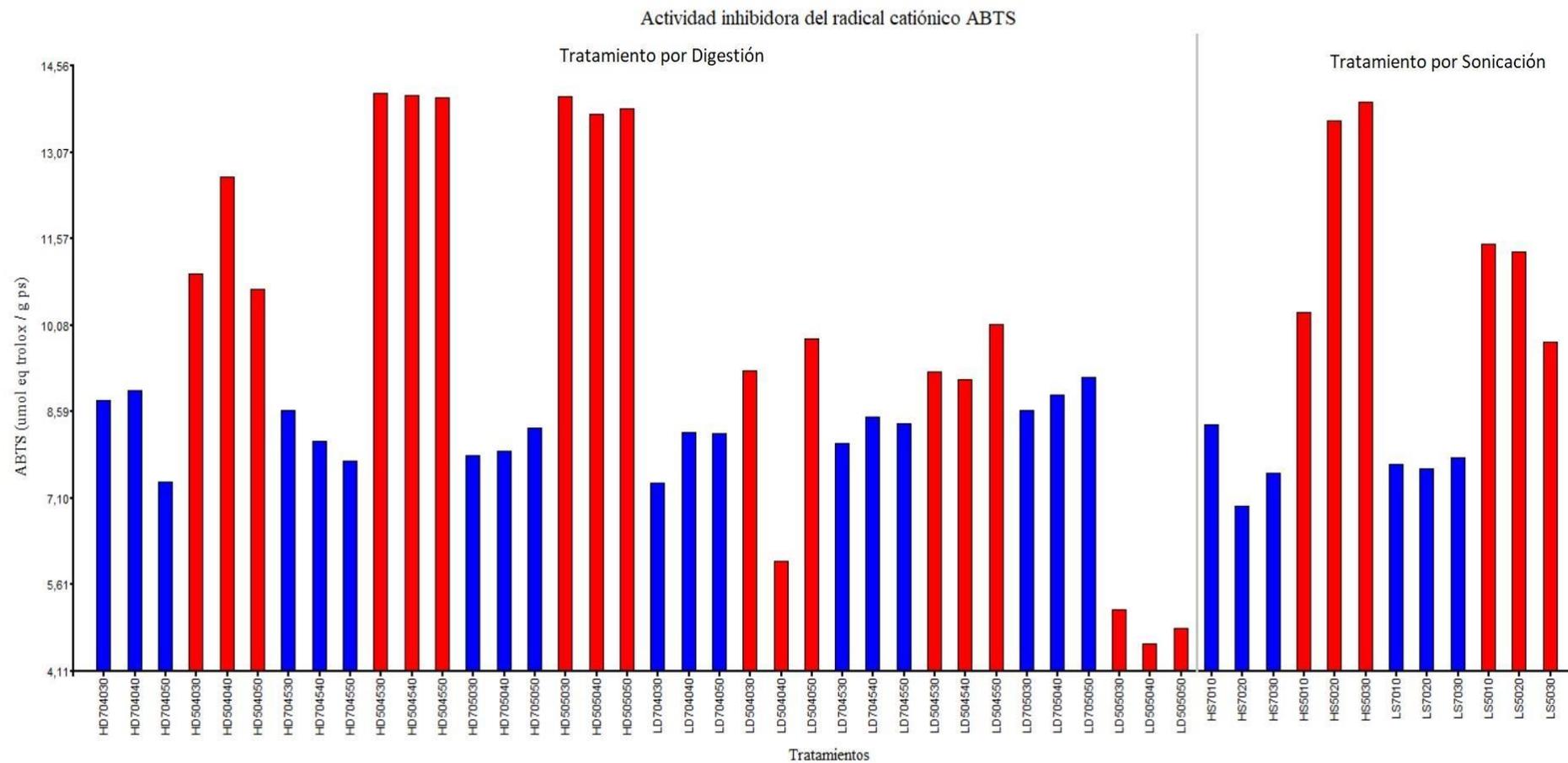
Etanol	Extracción	DPPH	ABTS	Fenoles Totales	Flavonoides
		μmol TE/g Ps	μmol TE/g Ps	μg GAE/g Ps	(μg QE/g Ps)
70%	Digestión	1.92±0.03	9.20±0.03	0.446±0.06	701±0.39
	Sonicación	2.52±0.12	8.37±0.02	0.309±0.016	309±1.57
50%	Digestión	3.68±0.02	14.06±0.03	0.945±0.006	1281.08±2.94
	Sonicación	3.48±0.06	13.84±0.11	0.867±0.046	263.58±2.35

ANEXO 2

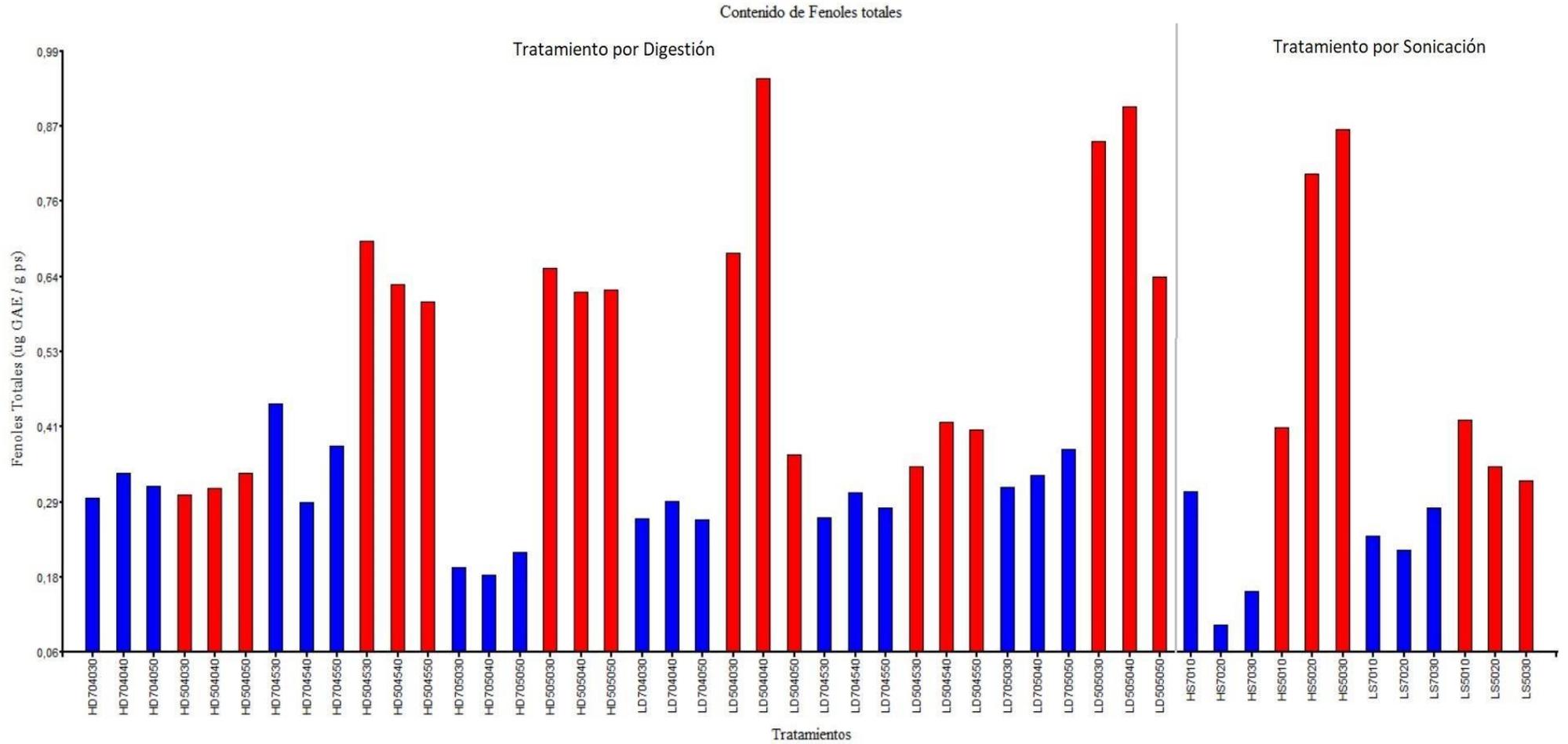
Desviación estándar de la actividad captadora de radicales libres DPPH



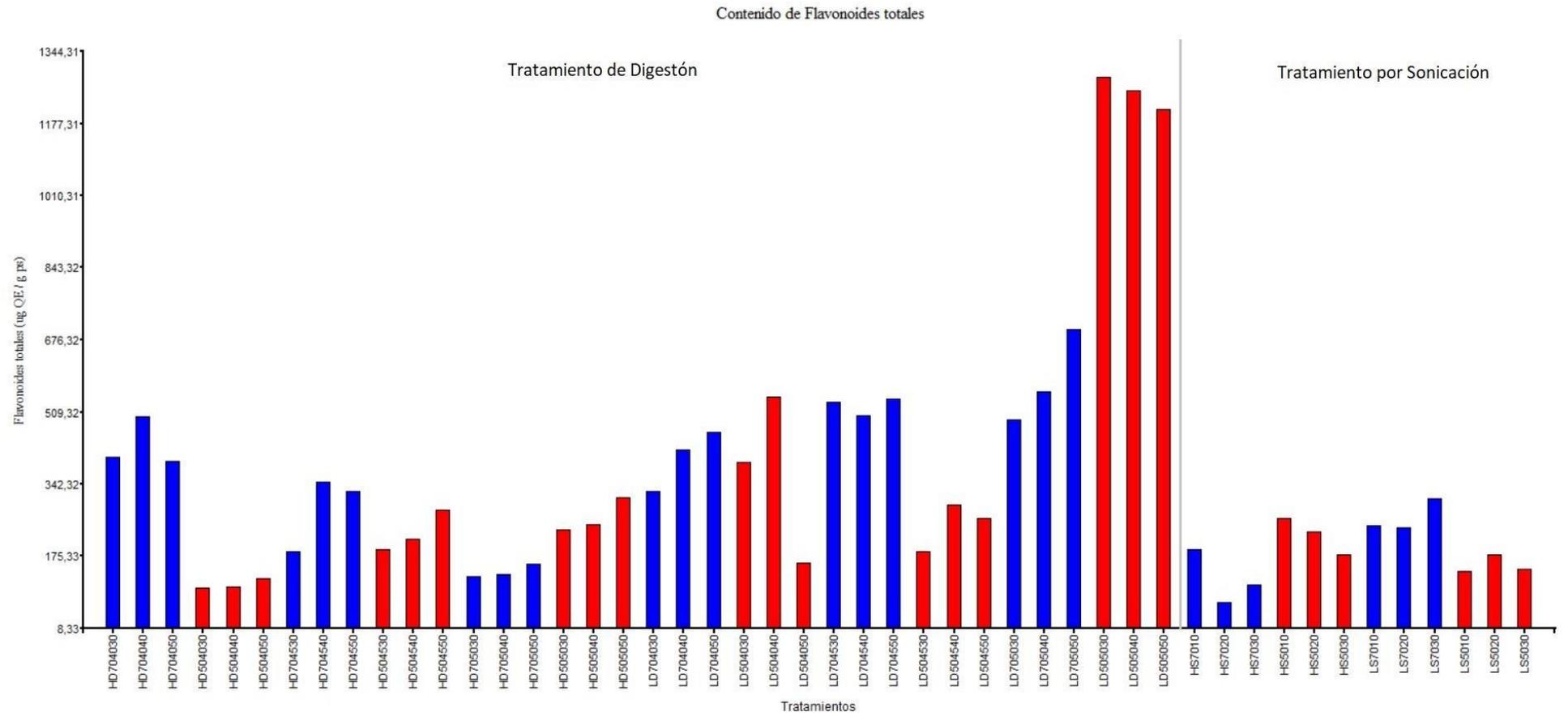
Desviación estándar de la actividad inhibidora del radicales catiónico ABTS



Desviación estándar del contenido de fenoles totales

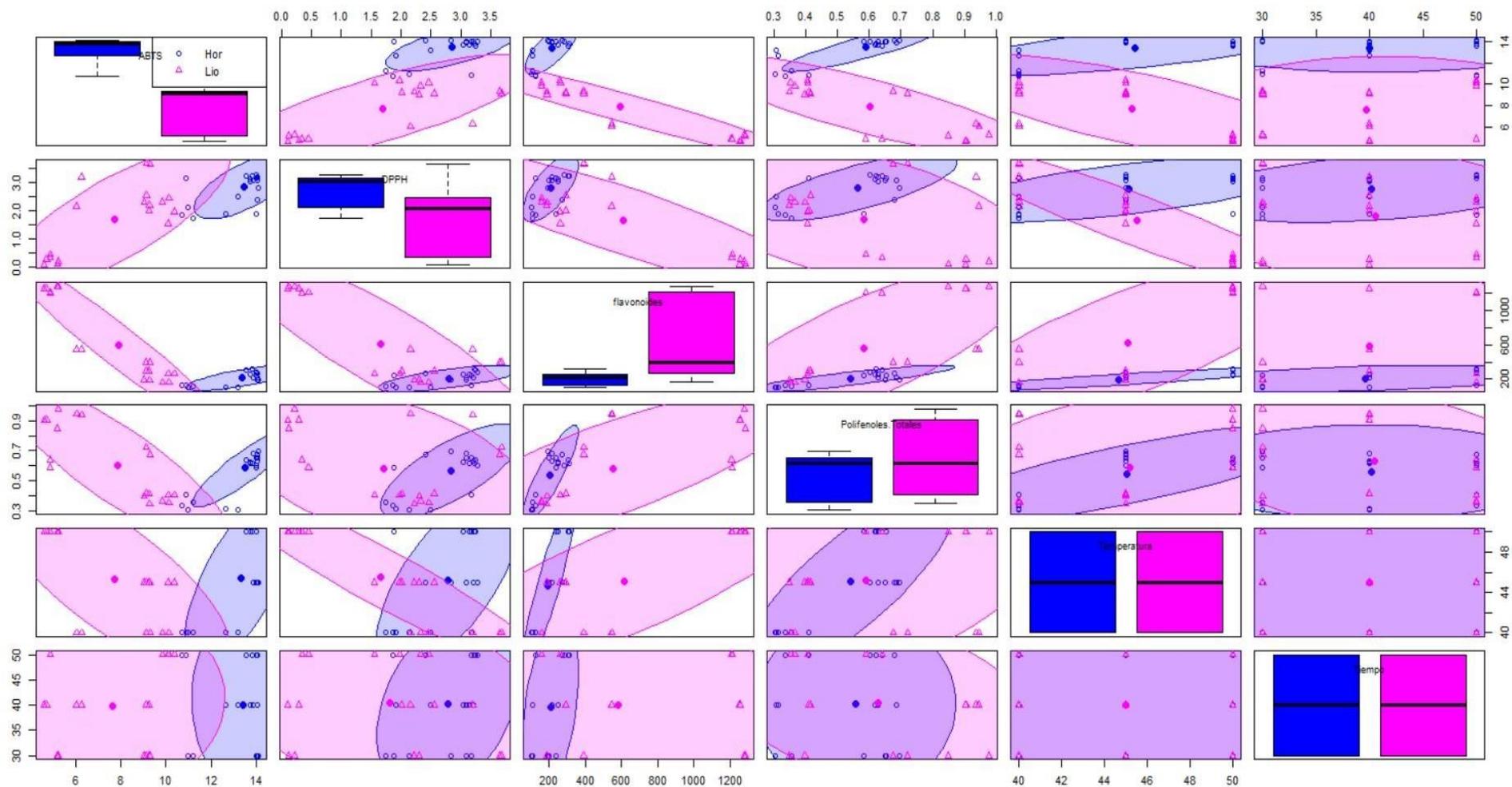


Desviación estándar de contenido de flavonoides totales



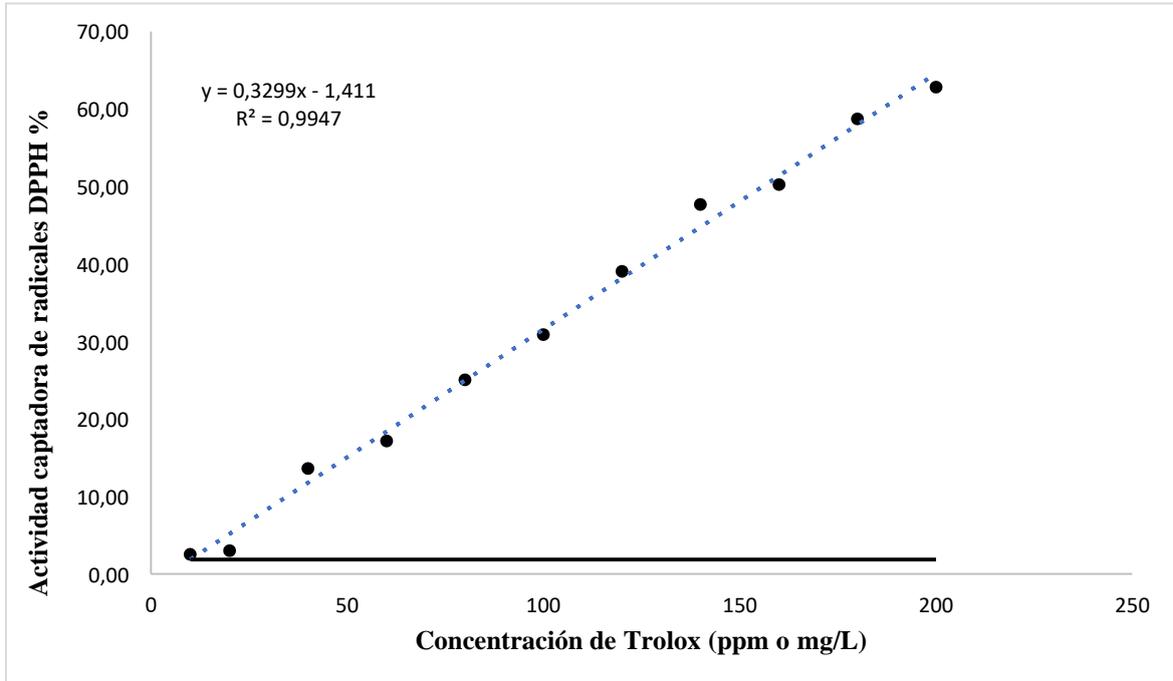
ANEXO 3

Matriz de dispersión para cada variable dependiente en relación con la temperatura y tiempo

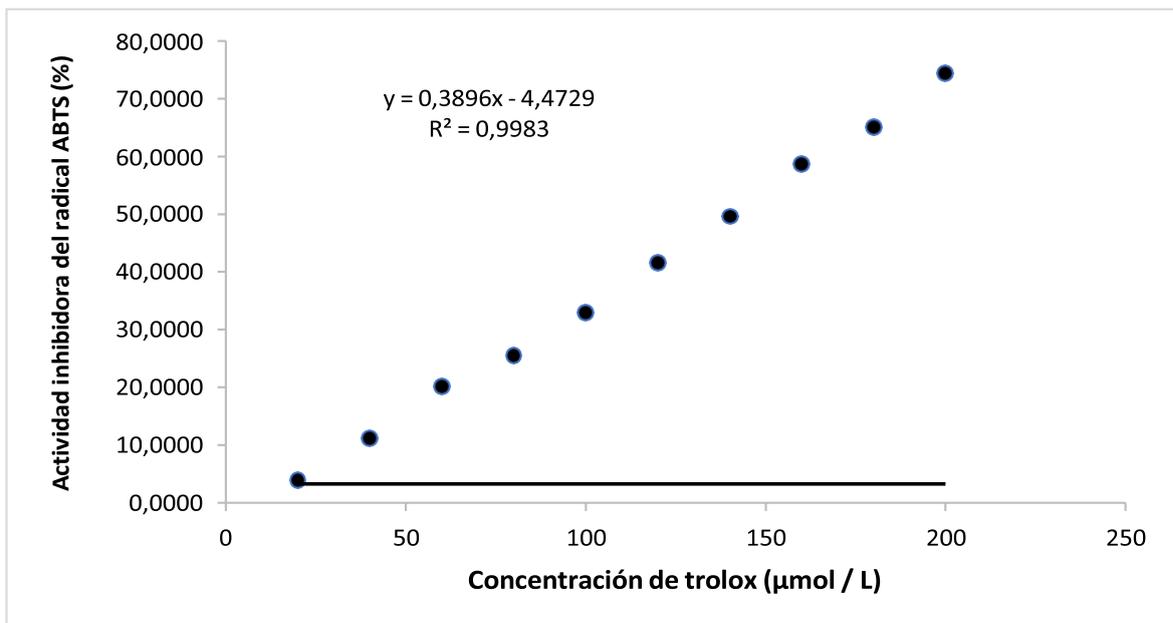


ANEXO 4

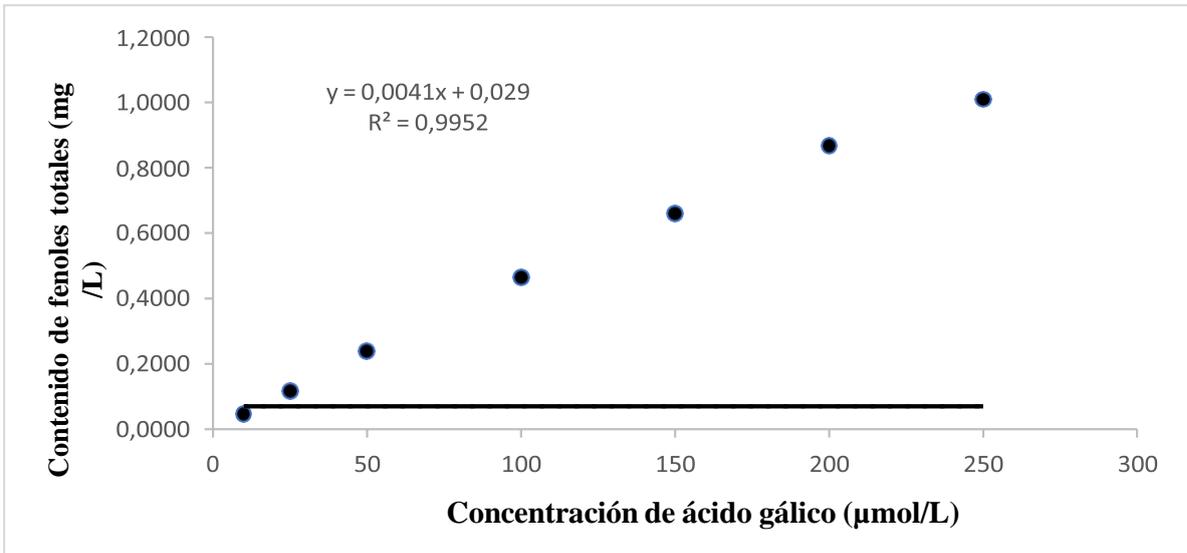
Curva de calibración de Trolox para la actividad captadora de radicales DPPH



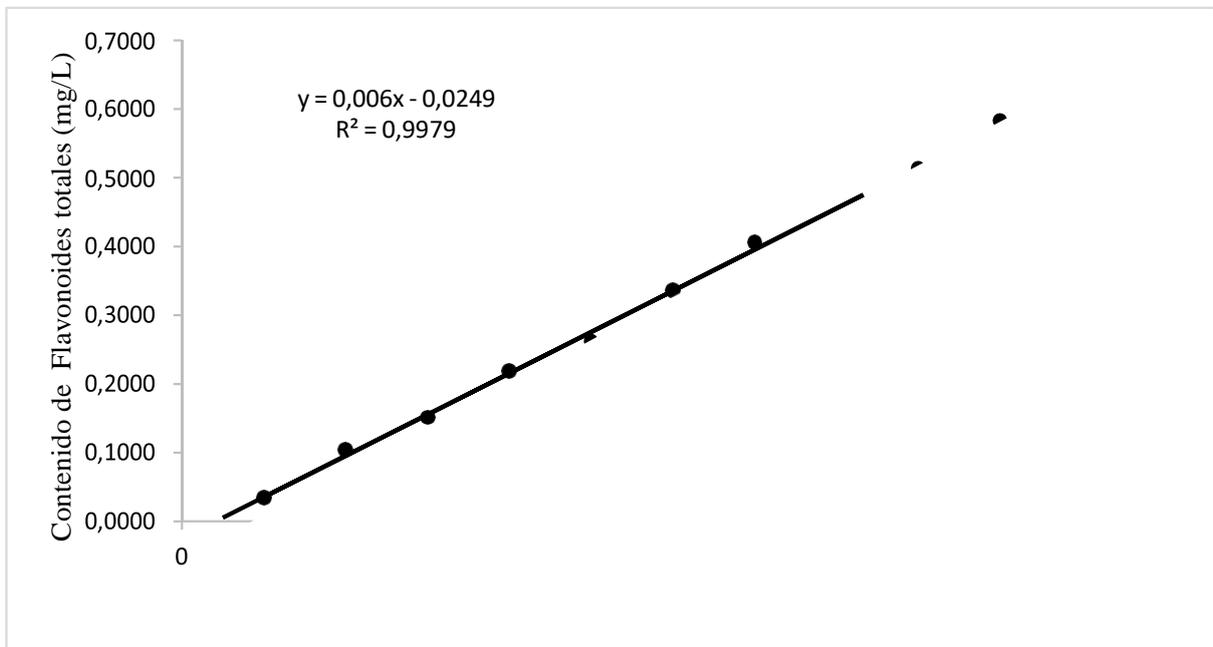
Curva de calibración de Trolox para la actividad inhibidora del radical catiónico ABTS



Curva de calibración de ácido gálico para el contenido de fenoles totales



Curva de calibración de catequina para el contenido de flavonoides totales



Curva de calibración de AIA para el contenido de auxinas totales

