

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

Variación espacial y temporal en el crecimiento y producción de biocompuestos de interés acuícola de la macroalga *Kappaphycus alvarezii*

**Proyecto Integrador**

Previo la obtención del Título de:

**Ingeniera Acuícola**

Presentado por:

Gabriela Alejandra Ruano Tomalá

Guayaquil - Ecuador

Año: 2024

**Escuela Superior Politécnica del Litoral**

**Faculty of Maritime Engineering and Marine Sciences**

Spatial and temporal variation in the growth and production of aquaculture interest  
biocompounds from the seaweed *Kappaphycus alvarezii*

**Integrative Project**

As a prerequisite for the degree of:

**Aquaculture Engineer**

Presented by:

Gabriela Alejandra Ruano Tomalá

Guayaquil - Ecuador

Year: 2024

## Dedicatoria

---

Este proyecto se lo dedico a Dios, a mis padres, a mi familia, a todos mis amigos y a mis mascotas.

A todos quienes han confiado en mis capacidades aun cuando yo he dudado de ellas.

A todos los profesores con vocación que me han enseñado y formado a lo largo de mi vida académica.

A todos los que me recuerdan con cariño y celebran mis logros.

Finalmente, quiero dedicármelo a mí y a todas mis versiones. A mi yo del pasado que ha afrontado todos los obstáculos que la vida le ha puesto, a mi yo del presente que se levanta cada día intentando dar lo mejor y a mí yo del futuro que espero alcance todo lo que he soñado.

## Agradecimientos

---

Gracias a Dios por el don de la vida.

A mi tutor MSc. Adrián Márquez por su guía, enseñanzas y por confiar en mí desde el comienzo. A mi co-tutora Bonny Bayot, PhD. por sus recomendaciones y conocimientos. A la Blga. Ana Ayong por ser no solo mi guía sino también mi amiga. A la Blga. Yessenia Pozo y a todos los trabajadores de CENAIM y del proyecto INÉDITA por su ayuda, espacio, tiempo y enseñanzas. A INÉDITA por el financiamiento.

A mis padres y mi ñaña por siempre apoyarme en todo lo que me propongo y nunca soltar mi mano. A mis abuelitos y a toda mi familia y amigos por ser mi motivación y siempre ayudarme. A Berlín por su fidelidad y compañía. A mis compañeros de carrera y a Keyla, por todo lo que vivimos juntos. A Yorvi por ser el compañero perfecto durante todo este tiempo, sin ti todo hubiera sido más difícil.

## Declaración Expresa

---

Yo (*Gabriela Alejandra Ruano Tomalá*) acuerdo y reconozco que la titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, información no divulgada y cualquier otro derecho o tipo de Propiedad Intelectual que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, incluyendo cualquier derecho de participación de beneficios o de valor sobre titularidad de derechos, pertenecerán de forma total, perpetua, exclusiva e indivisible a LA ESPOL, sin limitación de ningún tipo. Se deja además expresa constancia de que lo aquí establecido constituye un “previo acuerdo”, así como de ser posible bajo la normativa vigente de transferencia o cesión a favor de la ESPOL de todo derecho o porcentaje de titularidad que pueda existir.

Sin perjuicio de lo anterior los alumnos firmantes de la presente declaración reciben en este acto una licencia de uso gratuita e intransferible de plazo indefinido para el uso no comercial de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada durante el desarrollo de su trabajo de titulación, sin perjuicio de lo cual deberán contar con una autorización previa expresa de la ESPOL para difundir públicamente el contenido de la investigación, desarrollo tecnológico o invención.

Así también autorizamos expresamente a que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra o invento, por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual.

Guayaquil, 21 de Marzo del 2024.



---

Gabriela Alejandra  
Ruano Tomalá

**Evaluadores**

## Evaluadores



Firmado electrónicamente por:  
JOSE JERRY LANDIVAR  
ZAMBRANO

---

**Jerry Landívar, MSc.**  
Profesor de Materia



Firmado electrónicamente por:  
ADRIAN JOSE  
MARQUEZ MONTIEL

---

**Adrián Márquez, MSc.**  
Tutor de proyecto



Firmado electrónicamente por:  
BONNY NARCISA BAYOT  
ARROYO

---

**Bonny Bayot, PhD.**  
Co-tutora de proyecto

## Resumen

Las macroalgas son fuente de alimento y de biocompuestos con propiedades cosméticas, farmacéuticas y nutracéuticas, sin embargo, Ecuador produce *Kappaphycus alvarezii* solo como fertilizante agrícola. Con el fin de generar valor agregado, se busca obtener biocompuestos de interés acuícola que sirven como nutracéuticos para camarón y así impulsar la producción de macroalgas. Para lograrlo es necesario evaluar la variabilidad espacial y temporal en el crecimiento y producción de dichos biocompuestos y esto se hizo en Santa Rosa de Salinas y Palmar, en donde se tomaron datos de temperatura, iluminación, nitrógeno y fósforo total, también se elaboraron extractos de macroalgas para cuantificar auxinas, fenoles, pigmentos y la actividad antioxidante y antibacteriana (cada dos semanas). Se halló que las concentraciones diferentes de nutrientes ( $p < 0,05$ ) no influían en la concentración de biocompuestos ni el crecimiento (13.8% semanal), por otro lado, las auxinas estaban relacionadas con el aumento de biomasa, mientras que la luminiscencia afectaba la producción de pigmentos producto de fotoinhibición, además a mayor temperatura, mayor actividad antioxidante, lo que a su vez estaba relacionado con la inhibición bacteriana. *K. alvarezii* tiene potencial uso acuícola en ambas zonas estudiadas de Ecuador por su producción de biocompuestos y crecimiento óptimo.

**Palabras Clave:** parámetros ambientales, variación bioquímica, producción comercial de macroalgas y valor agregado

## **Abstract**

*Seaweed is a source of food and biocompounds with cosmetic, pharmaceutical, and nutraceutical properties. However, in Ecuador, Kappaphycus alvarezii is produced only as an agricultural fertilizer. Aiming to create added value, there is an interest in obtaining biocompounds with aquaculture interest that can serve as nutraceuticals for shrimp, thereby boosting seaweed production. To achieve this, it's necessary to evaluate the spatial and temporal variability in the growth and production of these biocompounds, which was done in Santa Rosa de Salinas and Palmar. Here, temperature, illumination, total nitrogen, and phosphorus data were collected. Seaweed extracts were prepared to quantify auxins, phenols, pigments, and antioxidant and antibacterial activity (every two weeks). It was found that different nutrient concentrations ( $p < 0.05$ ) did not influence the concentration of biocompounds or growth (15.3 and 13.8% weekly). On the other hand, auxins were related to biomass increase, while luminescence affected pigment production due to photoinhibition. Additionally, higher temperatures led to increased antioxidant activity, which was related to bacterial inhibition. K. alvarezii shows potential for aquaculture use in both studied areas of Ecuador due to its biocompound production and optimal growth.*

*Keywords: Environmental parameters, Biochemical variation, Commercial seaweed production, Added value*

## Índice general

Evaluadores.....	5
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Índice general.....	9
Abreviaturas.....	12
Simbología.....	13
Índice de figuras.....	14
1. Capítulo 1.....	15
1.1. Introducción.....	16
1.2. Descripción del problema.....	19
1.3. Justificación del problema.....	20
1.4. Objetivos.....	21
1.4.1. Objetivo general.....	21
1.4.2. Objetivos específicos.....	21
1.5. Marco teórico.....	21
1.5.1. Macroalgas.....	21
1.5.2. Macroalgas a nivel mundial.....	22
1.5.3. Macroalgas en Ecuador.....	22

1.5.4.	<i>Kappaphycus alvarezii</i> .....	22
1.5.5.	Compuestos bioquímicos de interés acuícola .....	23
1.5.6.	Bioactividad .....	24
1.5.7.	Parámetros de ambientales.....	25
2.	Capítulo 2 .....	27
2.1.	Metodología .....	28
2.1.1	Cultivo de macroalgas.....	28
2.1.2	Crecimiento.....	30
2.1.3	Monitoreo de parámetros ambientales.....	30
2.1.4	Obtención de extractos.....	30
2.1.5	Caracterización bioquímica .....	31
2.1.6	Actividad antioxidante .....	32
2.1.7	Actividad antibacteriana .....	32
2.1.8	Análisis estadístico.....	33
3	Capítulo 3 .....	35
3.1	Resultados y análisis .....	36
3.1.1	Parámetros ambientales .....	36
3.1.2	Crecimiento .....	39
3.1.3	Fenoles totales.....	42
3.1.4	Pigmentos.....	43

3.2	Bioactividad .....	45
3.2.3	Actividad antioxidante .....	45
3.2.4	Actividad antibacteriana .....	46
3.3	Análisis de Componentes Principales .....	47
4	Capítulo 4 .....	49
4.1	Conclusiones y recomendaciones .....	50
4.1.1	Conclusiones .....	50
4.1.2	Recomendaciones .....	51
	Referencias .....	53

## Abreviaturas

PA	Palmar
ST	Santa Rosa
GAE	Ácido Gálico
MH	Masa Húmeda
MS	Masa Seca
PT	Fósforo total
NT	Nitrógeno total
IAA	Indol 3 acético
GAE	Ácido gálico
CENAIM	Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas
INÉDITA	Programa Nacional de Financiamiento para la Investigación y Desarrollo Tecnológico

## Simbología

$\mu\text{g}$       microgramos

$\text{pmol}$       picomoles

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Producción acuícola mundial 1991-2020 (FAO, 2022) .....	17
<b>Figura 2.</b> Producción mundial de pesca de captura y acuicultura a nivel mundial (FAO, 2022) .....	18
<b>Figura 3.</b> Ubicación de ambas zonas de cultivo.....	28
<b>Figura 4.</b> Diseño de sistemas de cultivos de <i>Kappaphycus alvarezii</i> (Proyecto Inédita) .....	29
<b>Figura 5.</b> Variación de la temperatura (°C) en la superficie del mar (1m de profundidad) .....	36
<b>Figura 6.</b> Variación de la iluminación en la superficie del mar a 1m de profundidad.....	37
<b>Figura 7.</b> Variación de nutrientes: Nitrógeno Total (A) y Fósforo Total (B) .....	39
<b>Figura 8.</b> Crecimiento de <i>K. alvarezii</i> en 2 zonas de cultivo en un periodo de 4 meses. ....	40
<b>Figura 9.</b> Concentracion de hormonas tipo auxinas de <i>K. alvarezii</i> . ....	42
<b>Figura 10.</b> Variación en la concentracion de fenoles totales de <i>K. alvarezii</i> .....	43
<b>Figura 11</b> Variación de clorofila A (A) y carotenoides (B).....	44
<b>Figura 12.</b> Variación de ficobiliproteínas: ficoeritrina (A) y ficocianina (B).....	45
<b>Figura 13.</b> Variación de la actividad antioxidante .....	46
<b>Figura 14.</b> Variación de actividad biológica.....	47
<b>Figura 15.</b> Análisis de componentes principales .....	48

## **1. Capítulo 1**

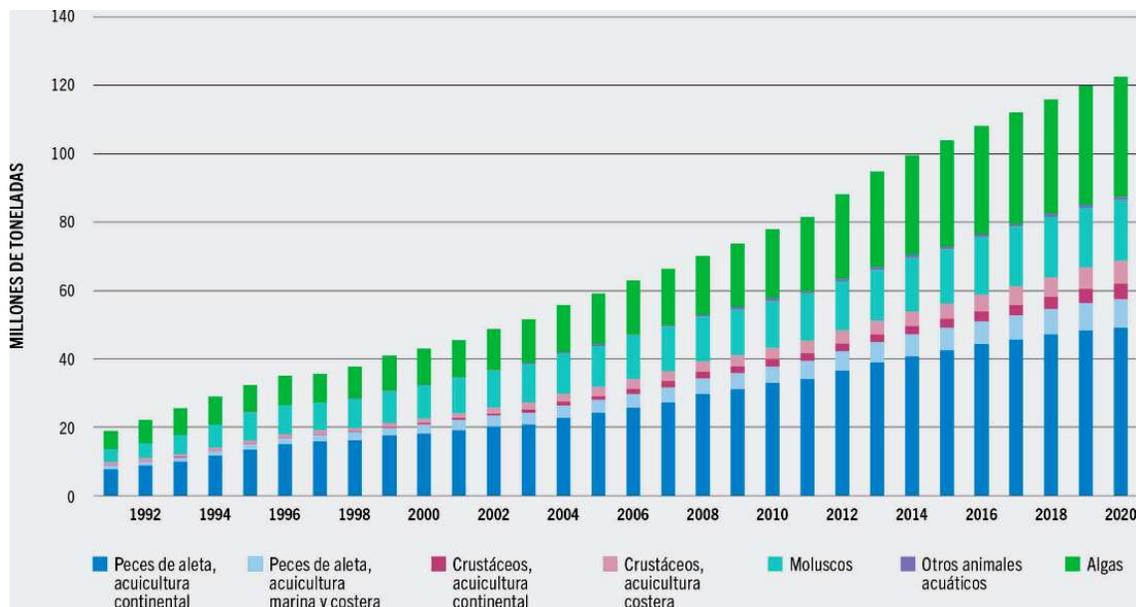
## **1.1. Introducción**

Uno de los mayores retos de la humanidad es responder a la demanda de alimento de los 9700 millones de personas en el planeta que se alcanzarán en el 2050 (FAO 2017). A pesar de todos los esfuerzos por aumentar la producción mundial de diferentes rubros (pesca, ganadería y agricultura), la acuicultura sobresale con un 6.7 % de incremento promedio anual (FAO, 2022) y no tiene las restricciones de espacio y sobreexplotación que presentan los otros sectores de producción (Lopes et al., 2020).

Existe una marcada tendencia al cultivo de especies que tengan bajo impacto ambiental, destacándose las macroalgas como el segundo rubro de producción acuícola con 36 millones de toneladas (FAO, 2022, Figura 1). La producción acuícola, según el World Bank Group (2016), debe aumentar un 50-70 % y en su mayoría deben ser cultivos de productores y consumidores primarios, que son los tipos de cultivos más sustentables hasta ahora desarrollados.

**Figura 1.**

*Producción acuícola mundial 1991-2020 (FAO, 2022)*

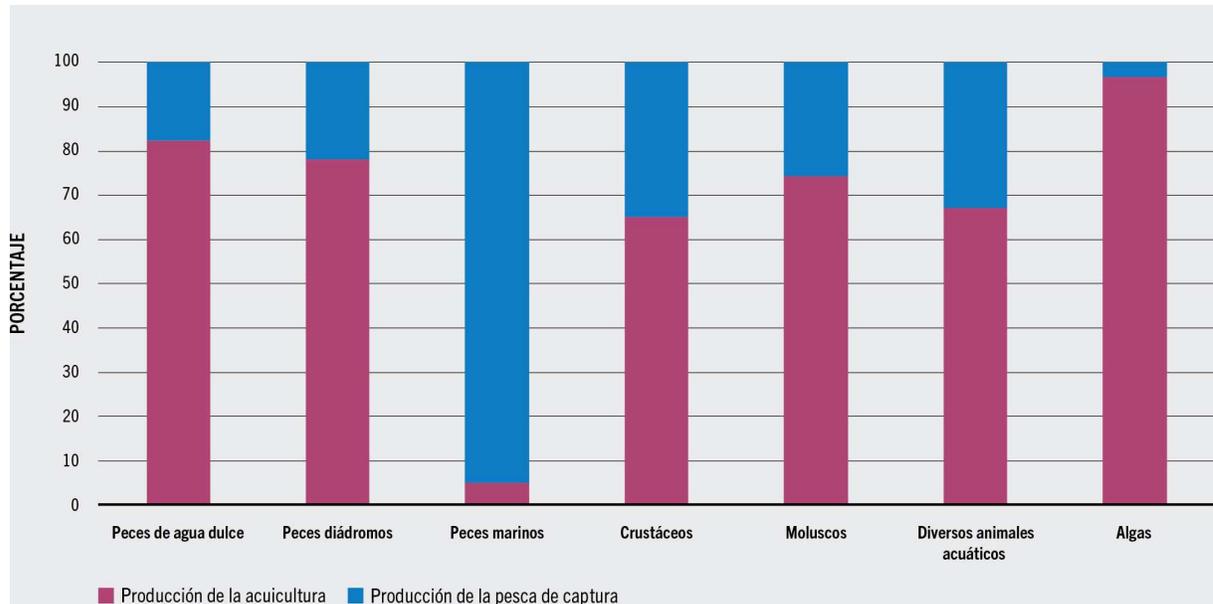


Debido a su crecimiento, contenido de proteínas y gran diversidad, las macroalgas tienen características ideales para acuicultura, destacando que al ser consumidores primarios no requieren alimento artificial y mejoran la salud de los océanos, pues son considerados sumideros de carbono, lo que reduce la huella ecológica de su producción (Filbee-Dexter et al., 2023).

El cultivo de macroalgas marinas se desarrolla en sistemas de maricultura para aprovechar al máximo los nutrientes del medio natural. Según la FAO (2022), este es el producto con mayor porcentaje de producción por acuicultura (Figura 2), y esta producción ha aumentado considerablemente en los últimos años; en el año 2000 solo se producían 12 millones de toneladas y para el 2020 se alcanzó 36 millones, pero el 97% de esta producción se desarrolla solo en Asia.

**Figura 2.**

*Producción mundial de pesca de captura y acuicultura a nivel mundial (FAO, 2022)*



Las macroalgas aparte de ser fuente de proteína son estudiadas por su alta producción de biocompuestos activos con propiedades aplicadas en salud humana, acuicultura y para la creación de alternativas sustentables en procesos industriales, como *Aspargopsis taxiformis*, que reduce la producción de metano en la industria ganadera (Roque et al., 2021). El potencial nutracéutico de las macroalgas permite reemplazar parte de la proteína de origen vegetal de los organismos acuícolas, obteniendo beneficios mediante la incorporación de biocompuestos inmunoestimulantes, bactericidas, antivirulentos, antifúngicos y antioxidantes (Cruz-Suárez et al., 2013; Fleurence et al., 2012; Pádua et al., 2015).

Ecuador es un país que reúne condiciones ambientales y geográficas ideales para el cultivo de macroalgas en maricultura, y de consolidarse podría contribuir al desarrollo socioeconómico del país y las comunidades costeras, a través de la creación de plazas de empleo, comercio y el

aprovechamiento de recursos a través de una acuicultura de bajo impacto (Macas-Mendez et al., 2021).

Debido a las propiedades bactericidas e inmunoestimulantes analizadas en diferentes especies de macroalgas, *K. alvarezii* se perfila como una buena alternativa para ser desarrollada en Ecuador, donde se reporta la tasa de crecimiento promedio más alta (15.2%) para la especie reportada (Montúfar-Romero et al., 2023).

## **1.2. Descripción del problema**

Es evidente que la acuicultura busca la obtención de alimentos sanos y de bajo impacto ambiental, a la vez que provee bioproductos de alto valor comercial (carragenina, agar, alginatos, pigmentos y aceites) y tratamientos sustentables para reducir el impacto de enfermedades acuícolas (Rezende et al., 2022; Thanigaivel et al., 2015, 2016)

Uno de los mayores desafíos que enfrenta la acuicultura del camarón del Pacífico es la propagación de enfermedades producto de la intensificación de los sistemas de cultivo, para lo que se han utilizado antibióticos, sin embargo, en la actualidad su uso está prohibido o limitado debido a la resistencia antibacteriana que pueden causar, abriendo un mercado a compuestos naturales de bajo impacto ambiental que puedan servir como métodos de prevención o tratamiento de enfermedades.

Se ha identificado el uso potencial como nutraceutico para camarones de *Kappaphycus alvarezii* (Armijos & Sánchez, 2023; Suantika et al., 2018), sin embargo, comprender cómo las variables ambientales afectan la producción de los biocompuestos de interés acuícola, es imperativo para desarrollar estrategias de cultivo y cosecha y determinar un período óptimo para la obtención de biomasa con valor agregado de esta macroalga. Este estudio de la relación entre

las variables ambientales y la producción de biocompuestos ha sido necesario y se ha realizado previamente con otras macroalgas comerciales como *Ulva fenestrata* (Steinhagen et al., 2022) y *Gracilariopsis persica* (Jeliani et al., 2018).

El presente trabajo aborda la influencia que tienen los parámetros ambientales sobre el crecimiento, variación bioquímica y bioactividad de la macroalga *K. alvarezii* en cultivos suspendidos en 2 zonas de la península de Santa Elena con características oceanográficas diferentes (Santa Rosa de Salinas y Palmar). Estas zonas fueron escogidas considerando, que la zona de Palmar es más profunda (16-18 metros) y tiene incidencias del estero y de la actividad camaronera que aportan nutrientes, mientras que Santa Rosa de Salinas (SR) es una zona con una influencia marina con aguas ligeramente más frías y una zona de cultivo menos profunda (6-4 metros).

Esta investigación se desarrolla dentro del Proyecto de Desarrollo de Bioeconomía de Macroalgas: Estrategia sostenible para mitigar enfermedades emergentes del camarón, financiado por la SENESCYT en la convocatoria INÉDITA.

### **1.3. Justificación del problema**

En Ecuador la producción de macroalgas es una industria en potencia, pero aún está en sus etapas iniciales de implementación y desarrollo, con muy pocas oportunidades de comercializar la biomasa producida, debido al valor obtenido como biofertilizante el cual resulta ser muy bajo (0,05\$ por kg de masa húmeda). Es por esto que generar valor agregado para la macroalga *K. alvarezii*, al ser usada en una de las industrias más potentes y fructíferas del país, ayudaría a potenciar la diversificación de la acuicultura, a partir de la obtención de compuestos de alto valor como nutraceúticos para camarón, que es el producto de mayor exportación del país; lograr la

inserción del uso de macroalgas en esta industria representa una nueva frontera en tratamientos generados en una industria local de bajo impacto y de forma sostenible.

## **1.4. Objetivos**

### ***1.4.1. Objetivo general***

Evaluar la influencia de los parámetros ambientales de dos localidades de la provincia de Santa Elena (Santa Rosa de Salinas y Palmar) en el crecimiento, producción de biocompuestos de interés para la acuicultura y bioactividad de la macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

### ***1.4.2 Objetivos específicos***

Evaluar la influencia de la temperatura, nitrógeno total, fósforo total y energía lumínica en el tiempo y su impacto en el crecimiento de *K. alvarezii* en cada una de las localidades de cultivo.

Evaluar la variación bioquímica de compuestos de interés para la acuicultura (pigmentos, auxinas y fenoles) y su actividad antibacteriana y antioxidante en cada una de las dos localidades de cultivo.

## **1.5. Marco teórico**

### **1.5.1 Macroalgas**

Las macroalgas son plantas que forman parte de la base de la cadena alimentaria en medios acuáticos marinos. Estas son las encargadas de producir materia orgánica y energía a través de la absorción de nutrientes, agua y CO<sub>2</sub> durante la fotosíntesis y se encuentran desde la zona intermareal hasta alrededor de 100 m de profundidad, dependiendo de su requerimiento lumínico. Se clasifican en Chlorophyta (verdes), Rhodophyta (rojas) y Ochrophyta (marrones) (Cuvi & Cornejo, 2020)

### **1.5.2 Macroalgas a nivel mundial**

Las macroalgas representan el segundo rubro de producción acuícola a nivel mundial (FAO, 2022), teniendo como productores principales a países como China y Japón. Actualmente se desarrollan cultivos industriales de más de 31 especies de macroalgas, de las cuales destacan *Laminaria japonica* (Laminaria del Japón), *Euchema spp.* *Gracilaria spp.* (Gracilarias), *Undaria pinnatifida* (Wakame), *Porphyra spp.* (Luche) y *Kappaphycus alvarezii*.

Las macroalgas son cultivadas para diferentes usos entre los que destacan la alimentación humana y de organismos en cultivos (algas frescas, secas, en pellet, extracto y polvo). También se las usa como biomonitores o biorremediadores por su dinámica con los nutrientes en lugares contaminados Otro de los usos es en la salud humana, pues las macroalgas poseen moléculas y compuestos nutraceuticos que sirven en las industrias farmacéutica y cosmética (Camurati et al., 2019). En acuicultura, se ha demostrado que el uso de macroalgas ayuda al control de bacterias patógenas como *Vibrio spp.* y *Yersinia ruckeri* (Zainuddin et al., 2020).

### **1.5.3 Macroalgas en Ecuador**

Actualmente, *Kappaphycus alvarezii*, especie introducida, es la única especie de macroalga marina comercial del país y con tecnología de cultivo desarrollada para maricultura. Esta comenzó a ser cultivada en 2011 por la comunidad de Santa Rosa de Salinas en un proyecto piloto de producción y se ha podido evidenciar a lo largo de los años que presenta un acelerado crecimiento, presentado altas tasas de crecimiento y rentabilidad económica en cultivos marinos (Torres & Jiménez, 2022).

### **1.5.4 *Kappaphycus alvarezii***

*Kappaphycus alvarezii* es una macroalga roja mundialmente cultivada con fines de investigación y comercialización, principalmente como fuente de carragenina la cual comenzó su

cultivo a finales de 1960 y ha sido introducida en más de 31 países en África, América y Asia (Mantri et al., 2017).

Para acuicultura en Ecuador esta macroalga tiene reproducción vegetativa, característica que facilita la propagación de cultivo al ser un método simple de siembra, pues se usa la misma biomasa de cosecha. Es importante destacar que esta especie posee flotabilidad negativa y no se adhiere al sustrato (Sepulveda, 2021), esto la vuelve una especie de bajo riesgo de invasión, debido a que la biomasa desprendida se va al fondo, donde no recibe suficiente luz solar para continuar su desarrollo y crecimiento.

#### ***1.5.5. Compuestos bioquímicos de interés acuícola***

##### ***1.5.5.1. Pigmentos (Clorofila a, Carotenoides y Ficobiliproteínas)***

La clorofila *a* es la clorofila más abundante en las algas verdes. Las clorofilas son pigmentos reconocidos por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes, por lo que se usan en las industrias médica y alimenticia (Ruiz-Santiago et al., 2019)

Los carotenoides son pigmentos fotosintéticos orgánicos solubles en grasas de suma importancia en los ecosistemas marinos. Los carotenoides están involucrados en el sistema endocrino, específicamente en la reproducción sexual de peces y crustáceos, también se relacionan con la producción de vitaminas y tienen propiedades antioxidantes como nutraceuticos del camarón (Meyers, 1998).

Las ficobiliproteínas que son proteínas solubles son consideradas pigmentos fotosintéticos accesorios. En un estudio realizado con *Gracilaria corticata* se identificó como la su ficobiliproteína ficoeritrina presentó actividad antioxidante cuando fue testeada con DPPH (Sudhakar et al., 2023).

### **1.5.5.2. Auxinas**

Las auxinas son hormonas que regulan el crecimiento y desarrollo de las macroalgas, y se ven involucradas en la división, elongación, diferenciación celular y respuesta a estímulos externos (Stirk & Van Staden, 2014).

La auxina índole-3-acético ha mostrado protección contra las especies de *V. harveyi*, *V. campellii* y *V. parahaemolyticus* cuando se los ha desafiado en larvas de artemia, reduciendo la motilidad de los vibrios y la formación de biofilm (Van Haesebroeck, 2022).

### **1.5.5.3. Fenoles (Polifenoles)**

Los polifenoles son compuestos fenólicos que intervienen en el crecimiento, reproducción y en el sistema de defensa de las macroalgas contra patógenos o radiación UV. Estos compuestos son de carácter antioxidante, pues tienen la capacidad de quelar metales y atrapar radicales libres, inhibir crecimiento de bacterias, hongos y virus (García et al., 2015).

## **1.5.6. Bioactividad**

### **1.5.6.1. Propiedad antibacteriana**

La actividad antibacteriana de las macroalgas contra bacterias Gram Positivas y Gram Negativas se han estudiado desde 1954 en diferentes especies de algas. La producción de compuestos con propiedades antibacterianas se puede ver afectada por el crecimiento y las condiciones ambientales del desarrollo de la macroalga y se ha postulado que estos compuestos aumentan su concentración cuando el cultivo se ve expuesto y responde a condiciones de estrés o a un ataque bacteriano (Tan et al., 2012).

Se ha descubierto que las macroalgas pueden tener efecto antimicrobiano contra cepas de vibrios, entre los que destacan *V. parahaemolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. vulnificus* y *alginoliticus* (Cruz-Suárez et al., 2013; Rudi et al., 2019; Thirunavukkarasu et al., 2013)

La macroalga roja *Gracilaria fisherie* ha presentado actividad antibacteriana contra *V. harveyi*, equivalente al antibiótico norfloxacino, en pruebas MIC y en pruebas desafío en *P. monodon*, donde se suministró el extracto de macroalga como parte del alimento, mejorando la supervivencia significativamente (Kanjana et al., 2011).

#### **1.5.6.2. Propiedad Inmunoestimulante**

El camarón no posee inmunidad adaptativa y depende de la inmunidad innata, es por esto que las mejoras del sistema inmunológico (Rendón & Balcázar, 2016), van orientadas a fortalecer el sistema inmune y no al desarrollo vacunas. Estudios han demostrado que las macroalgas poseen compuestos como aminoácidos y carragenina que mejoran la actividad inmunológica contra bacterias tipo *Vibrio* (Hardjani et al., 2017).

La macroalga *Padina tetrastomatica* al ser suministrada a través del alimento a juveniles de *P. monodon* desafiados contra *V. parahaemolyticus*, mostró un aumento en el conteo de hemocitos totales post-infección lo cual evidencia un aumento en la actividad inmune (AftabUddin et al., 2021).

#### **1.5.6.3. Propiedad antioxidante**

Los biocompuestos encontrados en las macroalgas son importantes para prevenir el daño que sufren las células, producto de los radicales libres y el estrés oxidativo (Alencar et al., 2014). Los extractos de algas marinas poseen propiedades antioxidantes que estarían posiblemente ligadas al contenido de fenoles totales (Echavarría et al., 2009), así como también a los carotenoides, la clorofila A y las ficobiliproteínas.

#### **1.5.7. Parámetros de ambientales**

Las macroalgas como productores y consumidores de compuestos inorgánicos tienen un mejor crecimiento ante la presencia de mayor cantidad de nutrientes, especialmente del amonio.

Estos compuestos nitrogenados le permiten generar tejidos y aumentar su biomasa. Las ficobiliproteínas son una forma en la que se acumulan estos compuestos nitrogenados (Ramos & Gallardo, 2021).

En adición, el fósforo es un nutriente indispensable para el crecimiento y supervivencia de las macroalgas. Si la disponibilidad de fósforo se ve afectada, se afectará su crecimiento y fisiología. Ante un aumento de fósforo inorgánico disuelto, la macroalga aumenta su tasa de captación de fósforo inorgánico, incrementando la actividad fotosintética y el contenido de pigmentos (Xu, 2010).

La temperatura óptima de crecimiento varía dependiendo de la especie de macroalga y suele estar relacionada con la temperatura del hábitat natural de la especie, aunque no siempre es así (Lobban & Harrison, 1994). Se ha demostrado que el contenido de pigmentos de las macroalgas puede variar según la cantidad de nutrientes que tengan disponible, pero también se puede ver afectado por la temperatura, dependiendo de la especie, por ejemplo, en un estudio realizado por Endo et al., (2017) un aumento de temperatura de 10 °C aumentó la clorofila de *U pinnatifida*.

La radiación fotosintética activa o PAR (por sus siglas en inglés) es el fragmento de luz solar que sirve para que las plantas puedan realizar la fotosíntesis (400-700 nm de longitud de onda) (Hernández et al., 2001). En un estudio realizado en especies de macroalgas de las divisiones Chlorophyta, Rhodophyta y Orchophyta por Güenaga (2011) se encontró que la concentración de compuestos fenólicos se redujo significativamente cuando se reducía la exposición a radiación PAR, simultáneamente se descubrió que para las macroalgas estudiadas la actividad antioxidante está relacionada de forma directa con la cantidad de polifenoles. Por otro lado, a mayor cantidad de radiación PAR y UV, mayor resultó ser la tasa de crecimiento.

## **2. Capítulo 2**

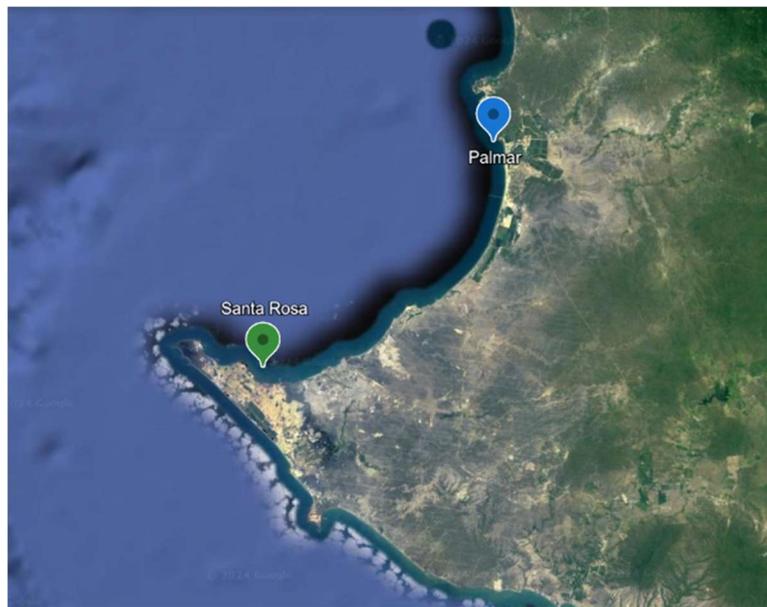
## 2.1. Metodología

### 2.1.1 Cultivo de macroalgas

Los cultivos de *Kappaphycus alvarezii* se encuentran instalados en 2 zonas de la península de Santa Elena. Zona 1: Palmar y Zona 2: Santa Rosa de Salinas (SR), Figura 3.

#### Figura 3.

*Ubicación de ambas zonas de cultivo*



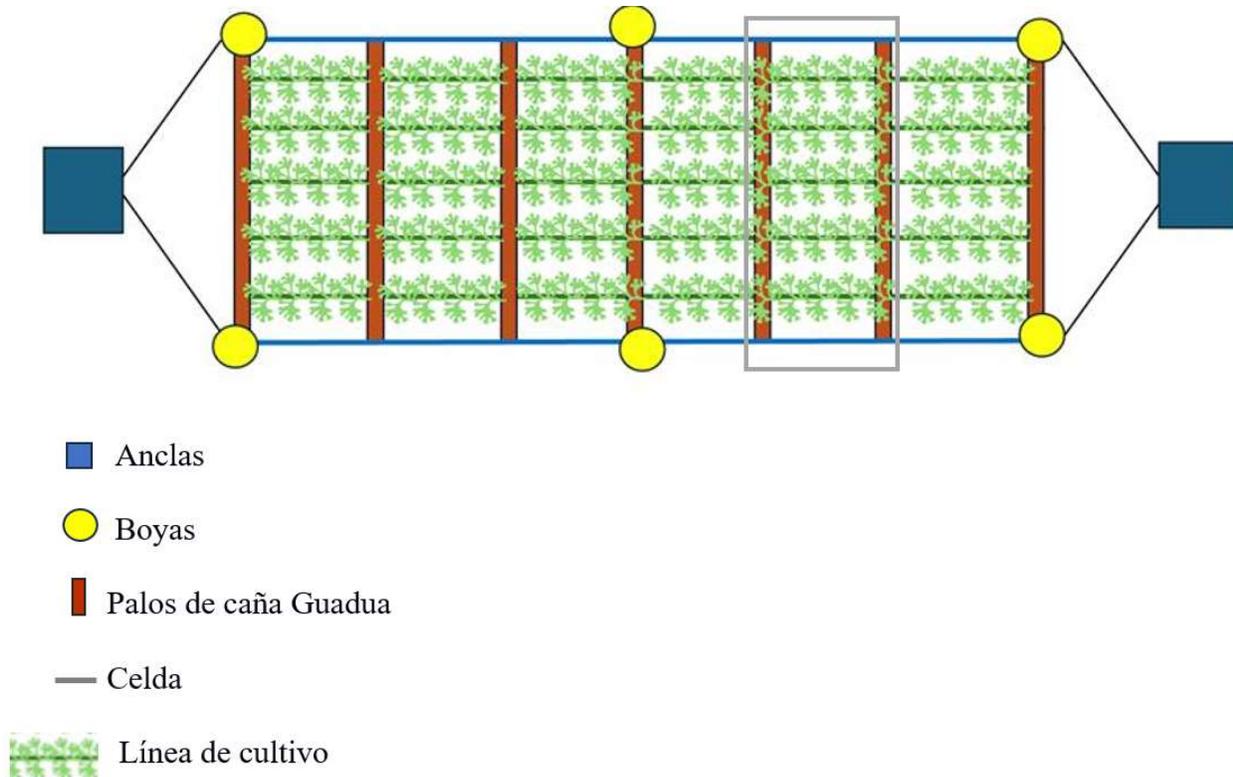
Estos cultivos están conformados de un sistema subsuperficial (entre 30cm y 60 cm de profundidad) compuesto por 3 partes básicas (Figura 4):

- 1) Anclaje: Mantiene el sistema en la zona establecida para el cultivo.
- 2) Flotación: Estructura compuesta por palos de caña Guadua y boyas que mantienen el sistema en flotación al nivel del mar
- 3) Crecimiento de macroalgas: Compuesto por líneas de 5 metros de longitud distribuidas longitudinalmente entre las cañas, alcanzando una profundidad de 30 a 50 cm. Este

sistema está diseñado para mantener las macroalgas siempre sumergidas y separadas entre sí por 40 cm con el fin de permitir el crecimiento continuo.

**Figura 4.**

*Diseño de sistemas de cultivos de *Kappaphycus alvarezii* (Proyecto Inédita)*



Las macroalgas fueron sembradas inicialmente con un peso promedio de  $820 \pm 50$  g de masa húmeda (MH) por cada línea de cultivo. En total se sembraron 6 celdas con 5 líneas cada una alcanzando una densidad inicial  $12$  plantas/m<sup>2</sup>.

Se realizaron muestreos cada 15 días de la biomasa de las líneas de cultivo y se tomaron al azar 300g de macroalga, los cuales fueron transportados en cajas isotérmicas hasta los laboratorios del CENAIM-ESPOL donde se realizaron análisis de cuantificación de fenoles, auxinas, pigmentos fotosintéticos, actividad antioxidante y antibacteriana

### **2.1.2 Crecimiento**

El registro del crecimiento se realizó a partir del incremento en peso de biomasa. Cada dos semanas, se pesaron 3 líneas de macroalgas aleatorias de ambos lugares. Para determinar el porcentaje de incremento, se usó la proporción del peso actual comparado con el peso por línea previo. Para las curvas de crecimiento, se utilizó el peso húmedo al final de cada uno de los períodos de cultivo, utilizando la ecuación de la tasa de crecimiento diario en porcentaje (% DGR) en masa húmeda, propuesta por Yong et al., (2013):

$$\%DGR = ((Mf - Mo)^{1/t} - 1) * 100$$

Donde:

Mo: Peso inicial (g)

Mf: Peso final (g)

t: Número de días de cultivo.

### **2.1.3 Monitoreo de parámetros ambientales**

El monitoreo de los parámetros ambientales se llevó a cabo para cada zona de cultivo. La temperatura y energía lumínica se midieron de forma continua con un termógrafo (Hobo Pendant Logger) el cual registró los datos cada 60 minutos a la profundidad de cultivo de las macroalgas. También se midieron los siguientes parámetros con una periodicidad semanal en las 2 zonas de cultivo: salinidad con un refractómetro y pH con un peachímetro (Oakton pc 2700). Finalmente, nitrógeno y fósforo totales se analizaron en el laboratorio de CENAIM-ESPOL siguiendo los métodos estándares para el Análisis de agua según APHA, 2012.

### **2.1.4 Obtención de extractos**

Una vez que las macroalgas estuvieron en el laboratorio, se procedió a lavarlas con abundante agua destilada, para retirar el resto de otras algas, epibiontes y detritus. Posteriormente,

se colectó 6g de biomasa de macroalga en tubos de Falcon con 8ml de agua y etanol para cada muestra, mientras que para las muestras agua-etanol (1:1), se colocó 4ml de agua y el etanol fue colocado al día siguiente. Cuando los tubos estaban rotulados y listos con los solventes respectivos, todos los tubos que contenían agua pasaron a un proceso de congelación-descongelación-vórtex para provocar rompimiento celular que se repitió de 3 a 4 veces. Luego de 4 días se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 20 min a 8°C, recolectando el sobrenadante en tubos nuevos rotulados. Este proceso se realizó para cada fecha de muestreo en ambos lugares.

### **2.1.5 Caracterización bioquímica**

Todos los análisis de este apartado se realizaron para todas las fechas de muestreo en los dos lugares, con 3 réplicas cada fecha.

#### **2.1.5.1 Fenoles (Polifenoles).**

Para contar el contenido de fenoles totales se siguió el protocolo detallado por Tanna et al. (2018). Inicialmente en una placa microElisa se colocó 2 réplicas de 25µL de extracto de macroalga, luego 25µL de solución Folin-Ciocalteu y una solución 1:1 de agua y etanol y 25 µL de carbonato de sodio al 10%. Finalmente, se cubrió la placa con aluminio y se mandó a reposo por una hora para leer la placa a 765 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro lector de microplacas VarioSkan.

#### **2.1.5.2 Hormonas (Auxinas).**

Para determinar la cantidad de auxinas presentes en los extractos de alcohol se utilizó el método de colorimetría de Salkowski (Glickmann & Dessaux, 1995), usando el ácido indol-3-acético para la curva de calibración.

#### **2.1.5.3 Pigmentos fotosintéticos (Clorofila A, carotenoides y ficobiliproteínas).**

Para la cuantificación de la Clorofila A, los carotenoides y las ficobiliproteínas se siguió la metodología de Lichtenthaler & Buschmann (2001) que consiste en lecturas en espectrofotómetro, utilizando UV-Vis Analyst.

En el caso de carotenoides se leyó a 666, 642 y 470 nm de longitud de onda 3ml de extracto etanólico de macroalga, con un blanco de 3 ml de etanol.

Para clorofila A se realizaron dos series de lecturas, una solo del extracto etanólico y otra con 100  $\mu$ L de HCl. Las longitudes empleadas fueron 666, 667 Y 750 y el blanco fue de 3 ml de etanol.

En la cuantificación de ficocianina y ficoeritrina se utilizó 3 ml de extracto acuoso y se leyó a 618- 645- 592 y 564- 592- 455 nm de longitud de onda respectivamente. El blanco fue 3 ml de agua.

### **2.1.6 Actividad antioxidante**

La actividad antioxidante total se determinó siguiendo el protocolo de Murray et al. (2004) utilizando la capacidad que los extractos tienen para atrapar radicales libres. Para la prueba espectrofotométrica se tuvo como blanco etanol en relación 1:1 y el control será el reactivo DPPH al 0.0004% previamente preparado con 100ml de etanol al 95% y 4mg de DPPH. Para las muestras se añadió 3.2 ml de solución DPPH y 200  $\mu$ L de extracto de *Kappaphycus alvarezii*. Se dejó esperar 15 minutos y se colocó 200  $\mu$ L de la reacción (3 réplicas), el blanco y el control, se cubrieron con papel aluminio y luego de 12 minutos se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm. Este proceso se realizó para todas las fechas de muestreo en ambos lugares.

### **2.1.7 Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana del extracto de *Kappaphycus alvarezii* se midió a distintas concentraciones con una prueba MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) con la cepa bacteriana

*Vibrio parahaemolyticus* del banco de cepas de CENAIM/ESPOL previamente activadas. El inóculo bacteriano se lo preparó con medio Luria Bertani (LB) al 2.5%, hasta alcanzar una densidad óptima adecuada de  $10^8$  UFC/ml, a partir de estas se hizo una dilución  $10^6$  UFC/ml. Para los extractos de la macroalga se los diluyó hasta alcanzar las concentraciones de 300, 3000 y 10000 mg/L en medio puro. Se colocó todas las soluciones preparadas y se inocularon con bacteria las que correspondía.

- Extracto de macroalgas: 180  $\mu$ L medio con extracto (diferentes concentraciones según correspondan) + 20  $\mu$ L de bacteria  $10^6$  UFC/ml
- Control Positivo: 180  $\mu$ L medio con florfenicol + 20  $\mu$ L de bacteria  $10^6$  UFC/ml
- Control Negativo: 180  $\mu$ L medio puro + 20  $\mu$ L de bacteria  $10^6$  UFC/ml
- Blancos con extracto: 200  $\mu$ L medio con extracto (3 concentraciones correspondientes)
- Blanco puro: 20  $\mu$ L medio puro

Una vez llenos todos los pocillos necesarios de las placas microElisa, estas fueron incubadas a  $28 \pm 2$  °C y leídas cada 2 horas durante 12 horas y a las 24 horas. Este proceso se realizó para todas las fechas de muestreo en ambos lugares.

### **2.1.8 Análisis estadístico**

Previa utilización de los estadísticos paramétricos, se evaluó la homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos. Se llevaron a cabo las pruebas paramétricas de análisis de varianza de dos vías (ANOVA) para determinar si existía diferencias significativas entre los dos lugares de muestreo con cada una de las variables dependientes (concentración de auxinas, fenoles, pigmentos y actividad antibacteriana y antioxidante), para las variables que mostraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) se les aplicó el método a posteriori de Tukey. En la segunda parte, se realizó el análisis de componentes principales para analizar la relación que existe entre las variables

ambientales con el crecimiento, actividad antioxidante, composición bioquímica, y actividad antibacteriana de los extractos para las dos zonas de cultivo.

### **3 Capítulo 3**

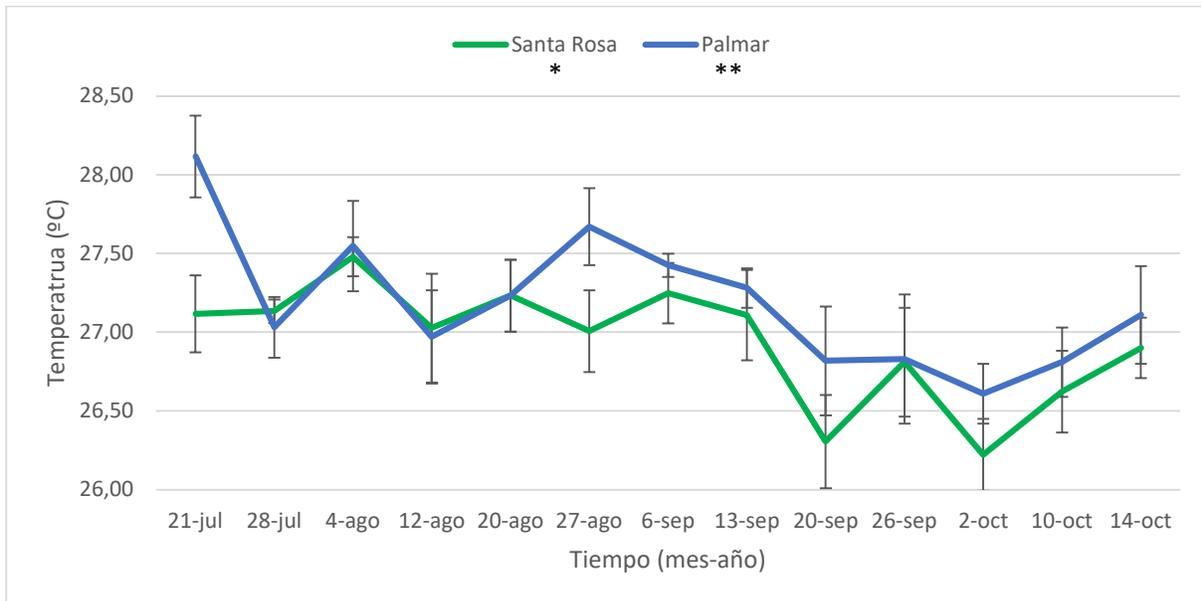
### 3.1 Resultados y análisis

#### 3.1.1 Parámetros ambientales

Las zonas estudiadas muestran variaciones de temperaturas anómalas (altas) que se relacionarían con el fenómeno de “El Niño”, instalado en las costas ecuatorianas desde mediados del 2023 (Naciones Unidas, 2023). Palmar registró temperaturas más altas, alcanzando  $28,12 \pm 0,26^\circ\text{C}$  a nivel superficial ( $>2\text{m}$ ) en la tercera semana de julio y su temperatura mínima se dio la primera semana de octubre ( $26,6 \pm 0,41^\circ\text{C}$ ) con un promedio general de  $27,12 \pm 0,42^\circ\text{C}$ . En SR, las temperaturas más altas, pero menores a Palmar, fueron en julio ( $27,1 \pm 0,24^\circ\text{C}$ , Figura 5). Durante el mes de agosto fue posible observar una variación de  $0,6^\circ\text{C}$  siendo Palmar más cálida. Al comparar estos resultados con los reportados para Santa Elena por la Cámara Nacional de Pesquería (CNP) durante agosto a septiembre 2023, se observa un patrón similar de disminución de temperaturas, siendo más altas las registradas este año.

**Figura 5.**

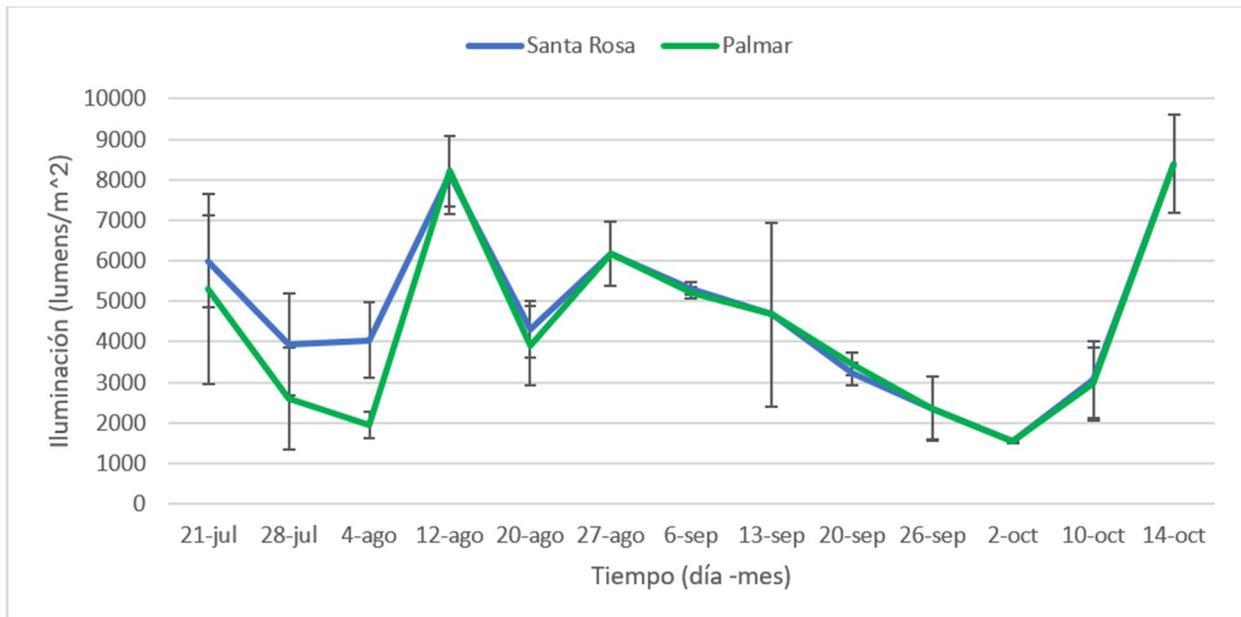
*Variación de la temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) en la superficie del mar (1m de profundidad)*



Las variaciones de  $8391 \pm 1221 - 1937 \pm 324$  lumens/m<sup>2</sup> en ambas comunidades se encuentran dentro del rango óptimo para el crecimiento de macroalgas rojas marinas el cual está entre 1000-10000 lumens/m<sup>2</sup> (Dieter, H., & Felix, L. 2012). En ambas localidades se puede observar un patrón de aumentos y disminuciones en el tiempo similares (Figura 6).

**Figura 6.**

*Variación de la iluminación en la superficie del mar a 1m de profundidad*



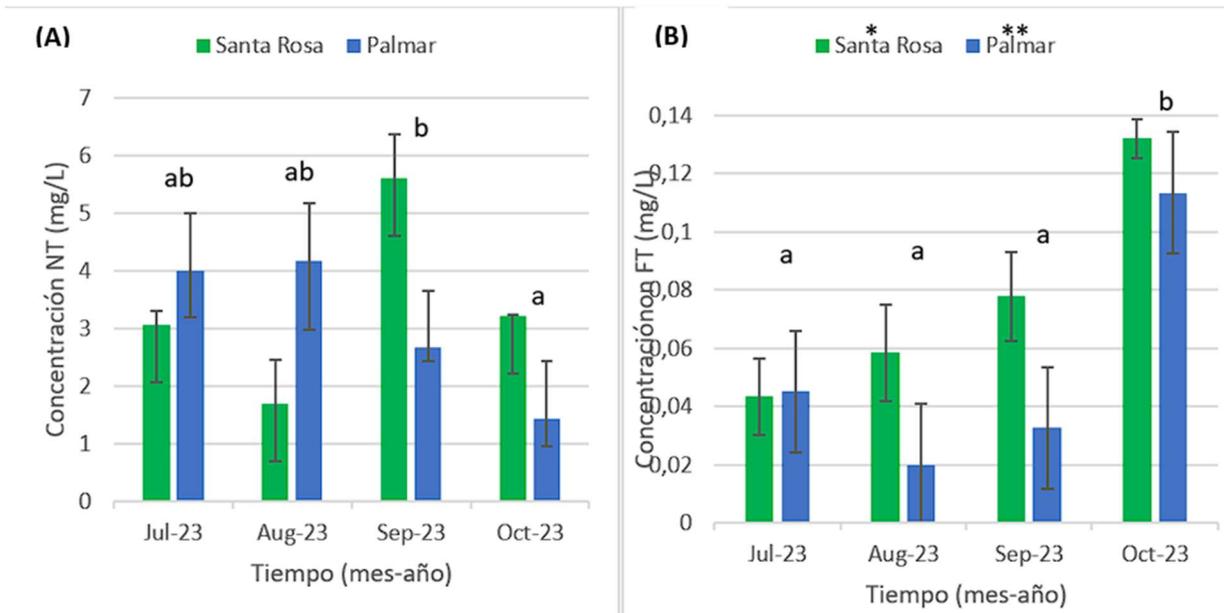
### **3.1.1 Nitrógeno Total (NT) y Fósforo Total (FT)**

El NT presentó diferencias significativas en el tiempo, principalmente en septiembre y octubre. En Palmar el valor máximo de NT fue en agosto con  $4,18 \pm 1,20$  mg/L y el de FT en octubre ( $0,11 \pm 0,03$  mg/L), mientras que el valor mínimo de nitrógeno se registró en octubre ( $1,44 \pm 0,48$  mg/L), el de fósforo en agosto ( $0,02 \pm 0,00$  mg/L). Estas variaciones se relacionarían al estero que puede tener influencia hasta 900m de la costa. SR durante el mes de septiembre presentó el valor más alto reportado para este periodo con  $5,61 \pm 0,76$  mg/L de NT. Para ambos sectores los niveles de NT estuvieron sobre el mínimo necesario para el crecimiento adecuado de macroalgas marinas (Francisco, G. 2012).

En el caso del FT, se observaron diferencias importantes entre los 2 lugares y significativas entre el tiempo ( $p < 0,05$ ) solo para el mes de octubre. La menor concentración se observó en el mes de agosto en Palmar ( $0,21 \pm 0,77$  mg/L). Los rangos normales de concentración de FT en el agua de mar se encuentran alrededor de 0,06 mg/L (Liang, Z. et al., 2022). A pesar de las grandes diferencias encontradas en las concentraciones de FT ( $0,021 - 0,13$  mg/L) no fueron limitantes para el crecimiento (Michael. Y.R., & Catriona. L.H. 2019). Los niveles de FT en octubre 2023 estuvieron sobre los niveles considerados máximos para el agua de mar superficial, por lo que existiría un aporte terrígeno o antropogénico, como el estero de Palmar y el puerto pesquero en SR. Diferentes estudios reportan como importantes fuentes de fósforo a los vertidos de aguas residuales tratadas o no tratadas, y en ambas zonas la fuente de fósforo estaría relacionada con la liberación de depósitos de rocas ricas en fosfato durante procesos naturales como la intemperie, la erosión y la lixiviación propios de los procesos de baja mar y pleamar (Benitez-Nelson, C. R. 2000).

**Figura 7.**

*Variación de nutrientes: Nitrógeno Total (A) y Fósforo Total (B)*



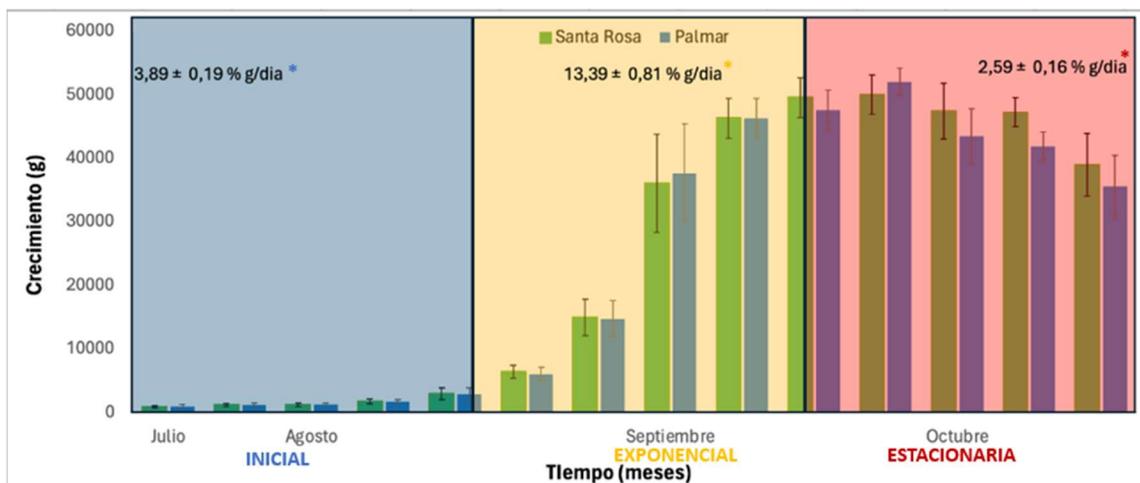
### 3.1.2 Crecimiento

Hubo un crecimiento acelerado en Palmar y SR con variaciones entre zonas menores a 10% de biomasa. Se identificaron tres fases de crecimiento durante los 4 meses de cultivo. La primera fase de arranque (lento) inició con biomasa post-siembra de  $820 \pm 50$ g MH, duró 27 días y su tasa de incremento diario fue de  $3,89 \pm 1,81$  y  $3,83 \pm 1,21$  %g/día para SR y Palmar respectivamente, seguido de un periodo exponencial de 26 días con un incremento de la biomasa promedio alto de  $13,82 \pm 3,21$ %g/día para los cultivos de SR y Palmar alcanzando hasta 39897,5g. Finalmente se identificó una fase estacionaria (lenta) de 45 días, entre  $2,85 \pm 0,81$ %g/día para SR y  $2,76 \pm 0,63$ %g/día para Palmar. A partir de este periodo las macroalgas por su alto peso (41-50kg) tuvieron desprendimientos (3-12kg/línea) mayormente en Palmar, que sesgan el análisis, por lo tanto, para este análisis solo se estimó el incremento para la fase estacionaria hasta el día 73 post-siembra. El porcentaje de crecimiento máximo se observó en la zona de cultivo de SR en la etapa

de crecimiento exponencial ( $13,82 \pm 3,21\%$ /día) que fue inferior al reportado para la misma zona en el 2016 ( $15,2\%$ /día, Montúfar-Romero et al., 2023), sin embargo; estos resultados muestran ser similares o superiores a los de otros países productores de *K. alvarezii* como India ( $14\%$ /día), Brasil ( $8,9\%$ /día) y Vietnam ( $10,9\%$ /día), en líneas generales las producciones reportadas en otras latitudes no exceden los  $10,8\%$ /día (Eswaran et al., 2002, de Paula et al., 1999, Onho et al., 1996, Montúfar-Romero et al., 2023). Esto deja en evidencia el potencial de cultivar *K. alvarezii* en Ecuador con una de las tasas de crecimiento más altas del mundo para esta especie.

**Figura 8.**

*Crecimiento de K. alvarezii en 2 zonas de cultivo en un periodo de 4 meses.*



Nota. \*tasa de incremento máxima reportada para las 2 zonas.

## 3.2 Composición Bioquímica

### 3.2.1 Auxinas

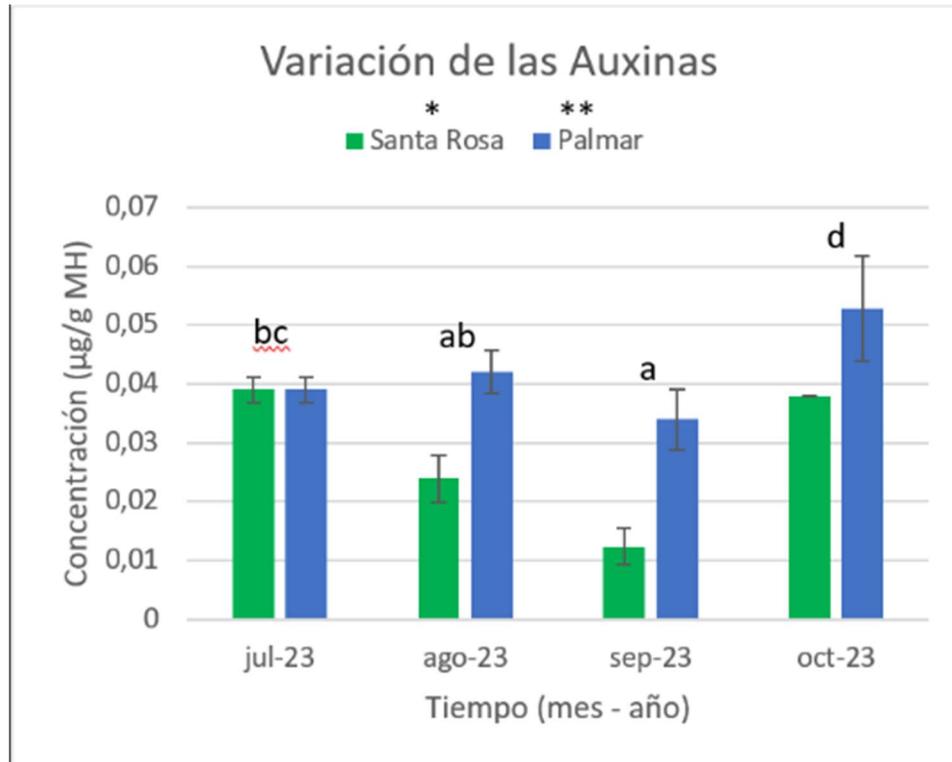
Al comparar ambas zonas, las concentraciones iniciales de auxinas son iguales, pues los propágulos sembrados son del mismo lote, por lo que, las variaciones observadas serían producto de la influencia de las condiciones ambientales características de cada zona. La concentración de auxinas presentó diferencias de más del 60% entre Palmar ( $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  MH) y SR especialmente durante el mes de octubre 2023, momento donde ambas localidades alcanzaron la concentración más alta ( $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g/g}$  MH, Figura 9), también presentaron diferencias significativas en el tiempo ( $p > 0,005$ ).

Las auxinas son fundamentales en los procesos fisiológicos de las plantas y aunque poco estudiadas en macroalgas (Tan et al., 2021), por pertenecer a un linaje evolutivo diferente existen algunas funciones que estarían relacionadas con las diferencias observadas durante este estudio como: 1) Regular el crecimiento y desarrollo de las algas marinas, influyendo en la división celular, el alargamiento, la diferenciación y contribuyendo a la morfología y estructura de sus talos y 2) Contribuir a las respuestas a factores estresantes ambientales como salinidad y temperatura para mejorar la supervivencia y la adaptación (Kularathne et al., 2021).

Tomando en consideración que  $0,01 \mu\text{g/g}$  MH equivalen a aproximadamente  $905 \text{pmol/g}$  MS, y comparando *K. alvarezii* con otras macroalgas en Brasil (Yokoya et al., 2010), las concentraciones halladas en este estudio son superiores a los reportados para *Gelidium floridanum*, *Porphyra acanthophora*, *Glacilaria birdiae* y solo sería inferior a *Chondracanthus tenuifrons* que ha presentado  $8875,1 \text{pmol/g}$  MS.

**Figura 9.**

*Concentración de hormonas tipo auxinas de K. alvarezii.*



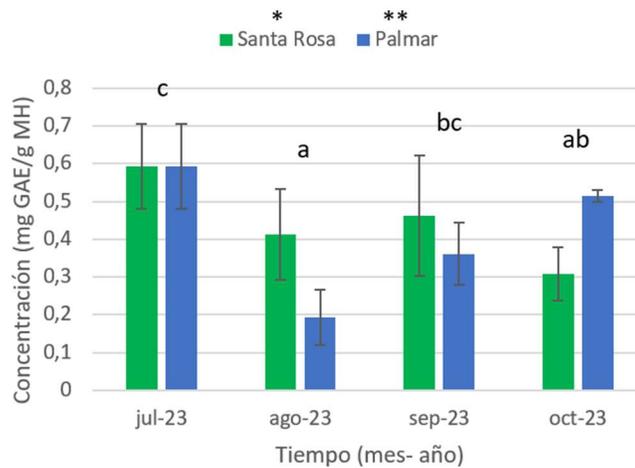
### 3.1.3 Fenoles totales

La variación de los fenoles entre localidades fue de hasta un 46% siendo máxima en agosto  $0,4 \pm 0,09$  y  $0,19 \pm 0,07$  mg GAE/g MH para SR y Palmar respectivamente. Los valores de fenoles totales fueron superiores durante los 3 primeros meses para la zona de SR, sin embargo; al final del estudio la zona de cultivo de Palmar presentó valores más altos ( $0,51 \pm 0,1$  mg GAE/g MH) que SR ( $0,3 \pm 0,10$  mg GAE/g MH), siendo los valores más altos los reportados durante julio con  $0,59 \pm 0,11$  mg GAE/g MH para ambas zonas. En cuanto a la variación temporal se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,005$ ), siendo julio, septiembre y agosto los más altos (Figura 10).

Considerando que  $0,10\text{mg GAE/g MH} \approx 1,6\text{ mg GAE/g MS}$  para este estudio, la macroalga *K. alvarezii* en Ecuador presentó valores similares a otras macroalgas rojas en Canadá como *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* y *Meristotheca papulosa* e inferiores a las macroalgas marrones *Ascophylum nodosum* y *Fucus vesiculosus* (Tibbetts et al., 2016).

**Figura 10.**

Variación en la concentración de fenoles totales de *K. alvarezii*.



**3.1.4 Pigmentos**

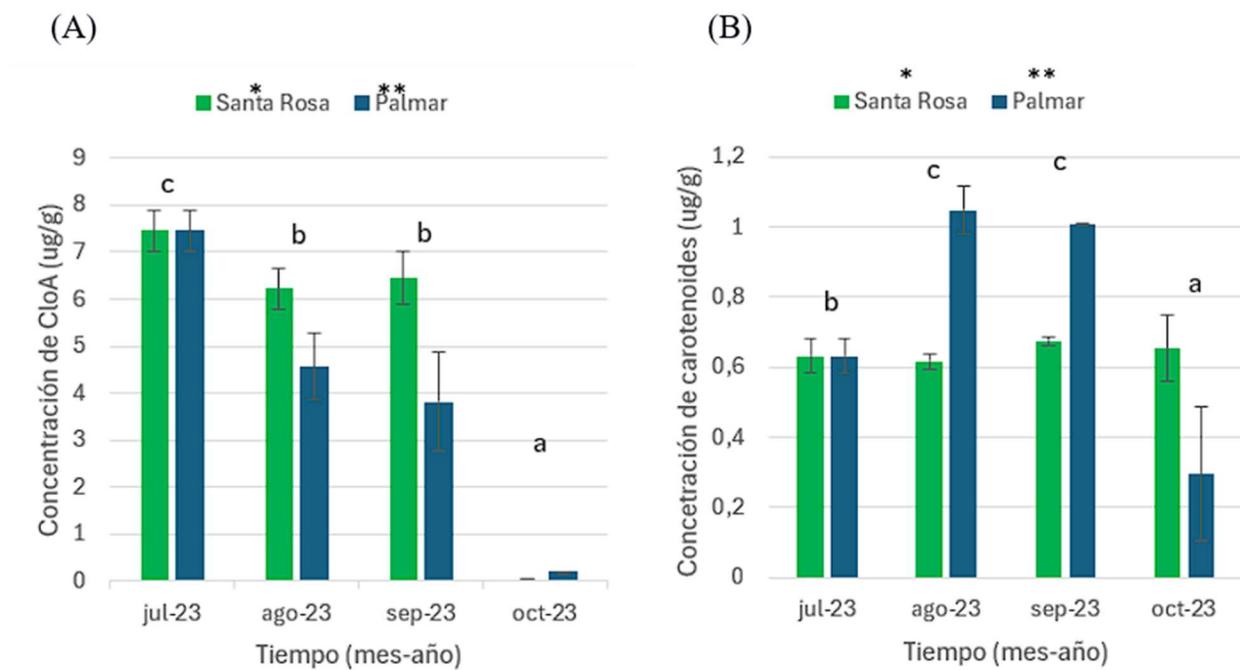
La producción de pigmentos demostró altas variaciones entre las 2 zonas de cultivo y diferencias significativas ( $p > 0,005$ ) a largo del tiempo. En julio y octubre la producción de clorofila fue máxima y mínima, siendo generalmente más alta en SR. Los carotenoides fueron más altos en agosto y septiembre, siendo más altos en Palmar, lo cual estaría ligado a la coloración amarillenta que se apreció durante ese tiempo en esa zona.

El contenido de Clorofila *a* es menor en las macroalgas Rhodophyta, comparadas con Orchrophyta y Chlorophyta, pero el contenido dependerá mucho de la concentración del extracto y del tipo de solvente (Othman et al., 2018).

La caída de clorofila *a* estaría ligada a la exposición muy alta de energía lumínica, tal como lo mencionan Sampath-Wiley et al. (2008) la macroalga *Porphyra umilicalis* (Rhodophyta) presentaba más contenido de clorofila cuando estaba en sombra que cuando estaba expuesta a luz, independientemente de la época, mientras que el contenido de carotenoides no se vio influenciado por la exposición a la luz.

**Figura 11**

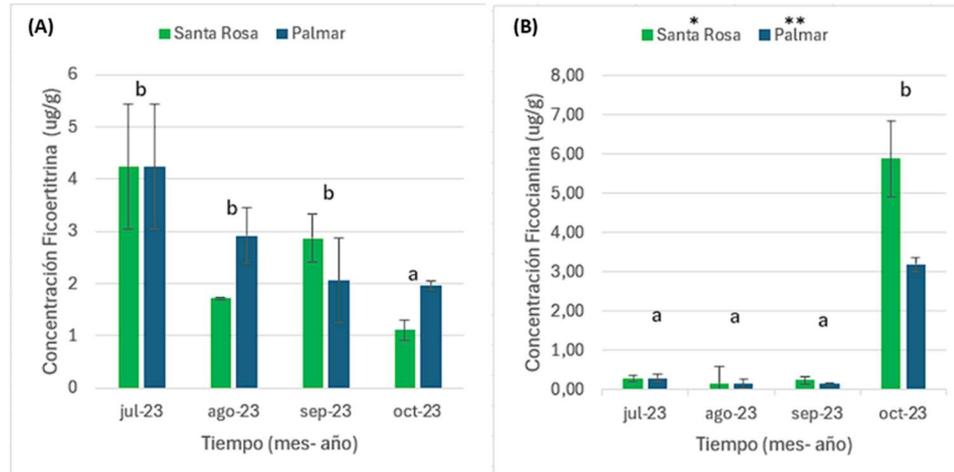
*Variación de clorofila A (A) y carotenoides (B)*



El contenido de ficoeritrina no presentó diferencias significativas entre los lugares, pero sí en el tiempo, siendo octubre significativamente menor que los demás meses (Palmar:  $1,12 \pm 0,09$  y SR:  $1,10 \pm 0,20 \mu\text{g/g}$ ). Por otro lado, la ficocianina fue diferente entre los lugares y también en el tiempo, siendo evidentemente mayor el mes de octubre ( $5,89 \pm 0,09$  SR y  $3,19 \pm 0,26 \mu\text{g/g}$  Palmar). Palmar tendía a tener menor contenido de ficocianina que SR.

**Figura 12.**

*Variación de ficobiliproteínas: ficoeritrina (A) y ficocianina (B)*



En un estudio realizado con *K. alvarezii* roja y verde los pigmentos de clorofila A y ficoeritrina se mantenían iguales (Aguirre-von-Wobeser et al., 2001), lo cual indicaría que la tonalidad verde no la da principalmente la clorofila A, esto estaría relacionado con los hallazgos de este estudio, que demuestra que la *K. alvarezii* en Ecuador, a pesar de ser verde, tiene contenido de clorofila A muy baja.

## 3.2 Bioactividad

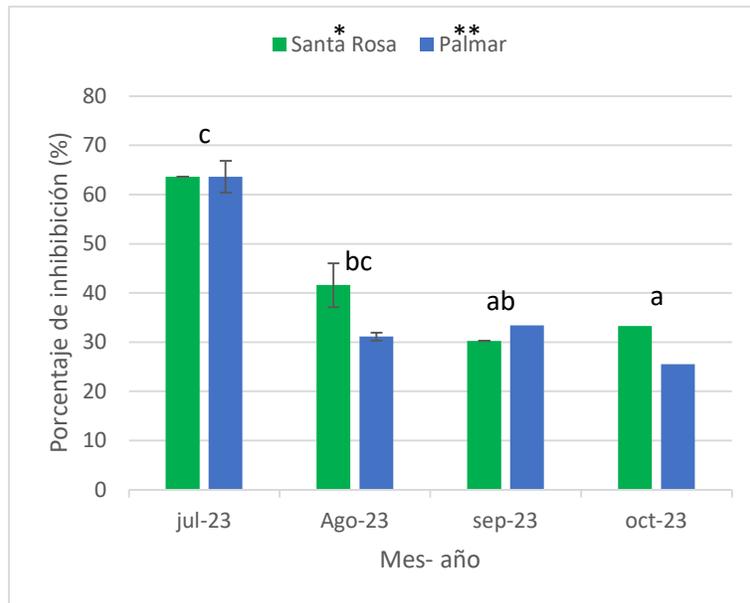
### 3.2.3 Actividad antioxidante

En julio la actividad antioxidante fue igual y alcanzó su valor máximo (63%) para ambas zonas, en Palmar esta actividad fue disminuyendo alcanzando su mínimo en octubre (25 %) y tuvo un valor promedio de 38%. En SR el valor mínimo se tuvo en septiembre (30 %). Considerando otras especies de macroalgas, el porcentaje de inhibición reportado por *K. alvarezii* fue menor a los presentados por *Padina pavonica*, *Ulva sp*, *Codium sp*. y *Gracilaria sp*. (81-93%) (García & Vargas, 2012) .

Los porcentajes de inhibición obtenidos en Ecuador son similares a Brasil, donde durante diferentes estaciones, la actividad antioxidante varió desde 20% hasta 55% de porcentaje de inhibición aproximadamente (Araújo et al., 2022).

**Figura 13.**

*Variación de la actividad antioxidante*



### 3.2.4 Actividad antibacteriana

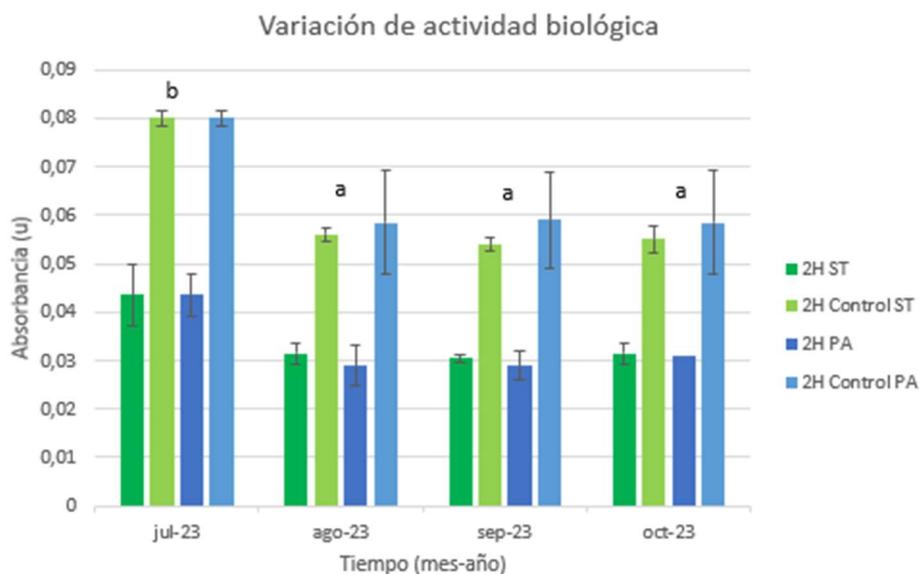
La actividad antibacteriana presentó ligeras diferencias entre las 2 zonas ( $P > 0,005$ ). En julio el crecimiento bacteriano medido en absorbancia fue menor, sin embargo, el porcentaje de inhibición fue bastante bajo.

*K. alvarezii* ha reportado inhibición en otras experimentaciones contra *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*, alcanzando los 24mm de halo de inhibición (Das et al., 2023). Durante esta experimentación, en cambio a mayor concentración de extracto, mayor densidad óptica. Una de las razones para este evento, es lo descrito por Guillén et al. (2024) quienes mencionan que el crecimiento exponencial de *V. coralliilytucys* cuando se usó *Acantophora*

*specifera* se pudo dar debido al contenido de carbohidratos y otros compuestos del extracto como los polisacáridos que pudieron ser utilizados como fuentes de carbono y energía.

**Figura 14.**

*Variación de actividad biológica*



### 3.3 Análisis de Componentes Principales

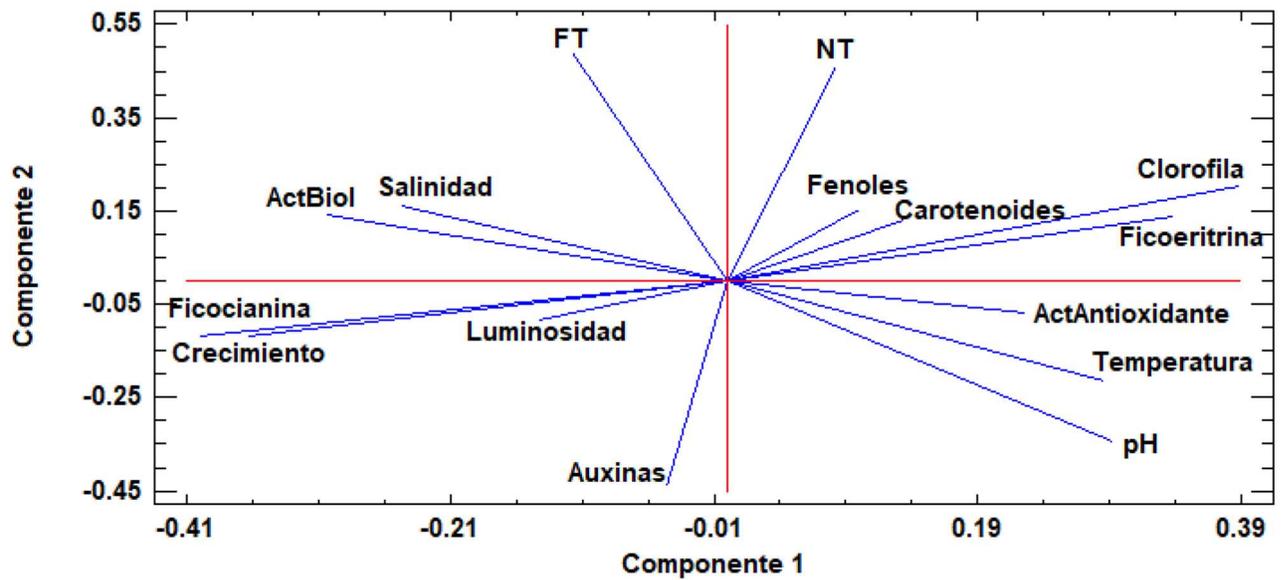
De acuerdo con el gráfico existe una relación directa entre la temperatura y la actividad antioxidante, lo cual correspondería a la respuesta de la macroalga ante el estrés generado por las altas temperaturas. Opuesto a esta actividad antioxidante está la actividad biológica que indica que, a mayor actividad antioxidante, mayor inhibición bacteriana.

La luminosidad se relaciona directamente con el crecimiento e inversamente a los pigmentos, este comportamiento se explicaría por los altos valores de iluminación que sobrepasarían el rango de ideal de las macroalgas, provocando lo que se conoce como fotoinhibición por una reducción de la fotosíntesis. Aun cuando se ha reportado que la profundidad ideal de cultivo de *K. alvarezii* es de 100cm, porque a menores profundidades la macroalga sufre fotodaño (Syam & Trijuno,

2013), el nivel de irradiación presentado en ambas zonas tuvo incidencia negativa sobre los pigmentos, lo que sería señal de fotodaño e fotoinhibición.

**Figura 15.**

*Análisis de componentes principales*



## 4 **Capítulo 4**

## 4.1 Conclusiones y recomendaciones

### 4.1.1 Conclusiones

Aunque la temperatura y la iluminación mostraron poca variabilidad, los nutrientes como el nitrógeno y el fósforo variaron con respecto al lugar y al tiempo, pero se mantuvieron dentro de rangos ideales para el crecimiento de las macroalgas, por lo que permitieron que estas se desarrollen en biomasa de forma óptima y sin limitaciones sin influir significativamente en su desarrollo o propiedades bioquímicas y antioxidantes.

Las condiciones de cultivo en ambas localidades favorecen el crecimiento de biomasa de macroalgas, alcanzando el 13,82% en SR de Salinas y 13,81% en Palmar, lo que confirma tasas similares a las previamente reportadas como las más altas para la especie en el mundo, es por esto que Ecuador es un país ideal para potenciar el cultivo de esta macroalga.

Existe una relación inversa entre la actividad antioxidante y la actividad antibacteriana; un aumento en la actividad antioxidante, causado por estrés, potencia la actividad antibacteriana, disminuyendo las poblaciones bacterianas expuestas al extracto acuoso (300mg/L) de la macroalga *Kappaphycus alvarezii*.

La iluminación incrementa el crecimiento de las macroalgas, aunque una iluminación excesiva puede llevar a la fotoinhibición y la degradación de clorofila a, lo que aumenta la producción de compuestos antioxidantes como fenoles, carotenoides y ficoeritrina, elevando la actividad antioxidante.

*Kappaphycus alvarezii* en Ecuador es una macroalga con múltiples usos potenciales, y considerando que ya se cuenta con la tecnología de cultivo con fines comerciales, es necesario explotar estos usos para poder generar valor agregado en la producción de macroalgas. *K.*

*alvarezii*, una macroalga de fácil cultivo y cuya tasa de crecimiento más alta del mundo se da en Ecuador, marcaría un nuevo hito en la acuicultura del país, abriendo paso a un aumento en la cartera de productos a través de la producción de distintas especies de macroalgas.

#### **4.1.2 Recomendaciones**

Hay que realizar más pruebas para determinar la razón detrás del incremento de la concentración bacteriana a mayor concentración de extracto. Para esto se puede analizar la interacción que existe entre el medio de cultivo, el extracto y la bacteria. También se puede evaluar la variación en el contenido de polisacáridos que pueden actuar como fuente de carbono.

Se debe continuar el estudio en un período más largo de tiempo para observar más variación dentro de las variables ambientales, así mismo se puede considerar la posibilidad de realizar este estudio en un año normal sin incidencia de fenómenos anómalos como “El Súper Niño”.

Si se evalúan más puntos a lo largo de la costa ecuatoriana, se podría inferir que la mayoría de la costa ecuatoriana es ideal para el cultivo de macroalgas.

De correrse un nuevo bioensayo usando extractos de macroalgas que no hayan presentado alta actividad antibacteriana contra *V. parahemolyticus*, podría indicar que en el camarón *Penaeus vannamei* los extractos de macroalgas tienen principalmente efecto inmunoestimulante.

Se puede evaluar mayor cantidad de concentraciones diferentes del extracto de macroalgas para conocer de manera más precisa la relación que existe entre la concentración de extracto y el incremento o disminución de la concentración de bacterias.

Los resultados de esta investigación abren el camino a crear estrategias pre y post cosecha, pues se podría considerar someter las macroalgas a temperaturas altas o a radiaciones lumínicas altas previo a la extracción para, por ejemplo, aumentar la actividad antioxidante del extracto.

Los resultados obtenidos sobre la relación entre la intensidad lumínica y la producción de pigmentos que indicarían fotoinhibición abren la nueva interrogante de si la profundidad del cultivo es la ideal para la producción de pigmentos como Clorofila a. A partir de esto se podría abrir investigación para diseñar un protocolo de cultivo específicamente considerando la incidencia lumínica de Ecuador.

## Referencias

- AftabUddin, S., Siddique, M. A. M., Habib, A., Akter, S., Hossen, S., Tanchangya, P., & Abdullah Al, M. (2021). Effects of seaweeds extract on growth, survival, antibacterial activities, and immune responses of *Penaeus monodon* against *Vibrio parahaemolyticus*. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 243–255.
- Aguirre-von-Wobeser, E., Figueroa, F. L., & Cabello-Pasini, A. (2001). Photosynthesis and growth of red and green morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta) from the Philippines. *Marine Biology*, 138, 679–686.
- Alencar, D. B., Silva, S. R., Pires-Cavalcante, K., Lima, R. L., Pereira Junior, F. N., Sousa, M. B., Viana, F. A., Nagano, C. S., Nascimento, K. S., & Cavada, B. S. (2014). Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, *Amansia multifida* and *Meristiella echinocarpa*, from the coast of Northeastern Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 86, 251–263.
- Araújo, P. G., Nardelli, A. E., Duran, R., Pereira, M. S., Gelli, V. C., Mandalka, A., Eisner, P., Fujii, M. T., & Chow, F. (2022). Seasonal variation of nutritional and antioxidant properties of different *Kappaphycus alvarezii* strains (Rhodophyta) farmed in Brazil. *Journal of Applied Phycology*, 34(3), 1677–1691.
- Armijos, K., & Sánchez, M. (2023). *Efecto de extractos de macroalgas sobre la resistencia a vibriosis de juveniles de camarón blanco (Penaeus vannamei) y respuesta inmune*. Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- Benitez-Nelson, C. R. (2000) The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth Sci. Rev.* 51, 109–135.

- Camurati, J., Hocsman, J., & Salomone, V. N. (2019). *Potencialidades de las macroalgas marinas argentinas*.
- Cruz-Suárez, L. E., Nieto-López, M., Tapia-Salazar, M., Gamboa-Delgado, J., Maldonado-Muñiz, M., Villarreal-Cavazos, D., & Ricque-Marie, D. (2013). Avances en la Valoración de Macroalgas del Género *Ulva* como Nutracéutico en *Litopenaeus vannamei*. *Avances En Nutrición Acuicola*.
- de Paula, E. J., Pereira, R. T. L. & Ohno, M. (1999). Strain selection in *Kappaphycus alvarezii* var. *alvarezii* (Solieriaceae, Rhodophyta) using tetraspore progeny. *J. Appl. Phycol.* 11, 111–121. <https://doi.org/10.1023/A:1008085614360>
- Dieter, H., & Felix, L. (2012). Physiological and Photomorphogenic Effects of Light on Marine Macrophytes. *Seaweed Biology (Ecological Studies, Vol. 219, pp. 3-24)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9_1)
- CNP. (2023). Base de datos. Cámara Nacional de Pesquería.
- Cuvi, N., & Cornejo, X. (2020). Una revisión actualizada de las macroalgas marinas del Ecuador continental. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 14(2).
- Das, D., Arulkumar, A., Paramasivam, S., Lopez-Santamarina, A., del Carmen Mondragon, A., & Miranda Lopez, J. M. (2023). Phytochemical constituents, antimicrobial properties and bioactivity of marine red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and seagrass (*Cymodocea serrulata*). *Foods*, 12(14), 2811.

- Echavarría, B., Franco, A., & Martínez, A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe Colombiano. *Vitae*, *16*(1), 126–131.
- Endo, H., Okumura, Y., Sato, Y., & Agatsuma, Y. (2017). Interactive effects of nutrient availability, temperature, and irradiance on photosynthetic pigments and color of the brown alga *Undaria pinnatifida*. *Journal of Applied Phycology*, *29*, 1683–1693.
- Eswaran, K., Ghosh, P. K. & Mairh, O. P. (2002) Experimental celd cultivation of *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty.ex.P. Silva at Man-dapam region. *Seaweed Res. Util.* *24*, 67–72.
- FAO. 2017. The future of food and agriculture – Trends and challenges. Rome.
- FAO. (2022). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. Hacia la transformación azul*. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>
- Filbee-Dexter, K., Pessarrodona, A., Duarte, C. M., Krause-Jensen, D., Hancke, K., Smale, D., & Wernberg, T. (2023). Seaweed forests are carbon sinks that may help mitigate CO<sub>2</sub> emissions: a comment on Gallagher et al. (2022). *ICES Journal of Marine Science*, *80*(6), 1814–1819. <https://doi.org/10.1093/ICESJMS/FSAD107>
- Fleurence, J., Morançais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., & Jaouen, P. (2012). What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture? *Trends in Food Science & Technology*, *27*(1), 57–61.

Francisco, G. (2012). Environment and Algal Nutrition. *Seaweed Biology (Ecological Studies)*, Vol. 219, pp. 3-24). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-](https://doi.org/10.1007/978-3-642-28451-9_1)

[28451-9\\_1](#)

García, E. M., Fernández, I., & Fuentes, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.*

García, H., & Vargas, A. (2012). *Determinar la actividad antioxidante de 4 especies de algas marinas recolectadas en playa Hermosa durante el periodo de Julio a Septiembre del 2012.* <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/6071/1/223278.pdf>

Glickmann, E., & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 793–796.

Güenaga, L. (2011). Influencia de la radiación solar y del amonio sobre la acumulación de sustancias antioxidantes en macroalgas marinas cultivadas en un sistema de biofiltración (Doctoral dissertation, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria).

Guillén, P. O., Rodríguez-Pesantes, D., Motti, P., Loor, A., Zheng, X., Wigby, J. N., Sonnenholzner, S., Mangelinckx, S., Bossier, P., & Van Den Hende, S. (2024). Characterized extracts of the tropical red seaweed *Acanthophora spicifera* protect *Ostrea edulis* larvae against *Vibrio coralliilyticus*. *Aquaculture*, 580, 740282.

Hardjani, D. K., Suantika, G., & Aditiawati, P. (2017). Nutritional Profile of Red Seaweed *Kappaphycus alvarezii* after Fermentation using *Saccharomyces Cerevisiae* as a Feed Supplement for White Shrimp *Litopenaeus vannamei* Nutritional Profile of Fermented Red Seaweed. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 11(4).

- Hernández, J., Escobar, I., & Castilla, N. (2001). La radiación solar en invernaderos mediterráneos (Vol. 157, pp. 18-27). Caja Rural.
- Jeliani, Z. Z., Yousefzadi, M., Pour, J. S., & Toiserkani, H. (2018). Growth, phytochemicals, and optimal timing of planting *Gracilariopsis persica*: An economic red seaweed. *Journal of Applied Phycology*, 30, 525–533.
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., & Wongprasert, K. (2011). Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(1), 389–396.
- Kularathne M. A. M. N, Srikrishnah S, Sutharsan S.(2021). Effect of Seaweed Extracts on Ornamental Plants: Article Review. Kenya. *Curr Agri Res* 2021; 9(3).. doi : <http://dx.doi.org/10.12944/CARJ.9.3.02>
- Liang, Z., McCabe, K., Fawcett, S.E., Forrer, H.J., Hashihama, F., Jeandel, C., Marconi, D., Planquette, H., Saito, M.A., Sohm, J.A., Thomas, R.K., Letscher, R.T & Knapp, AN. (2022) A global ocean dissolved organic phosphorus concentration database (DOPv2021). *Sci Data* 9, 772 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01873-7>
- Lichtenthaler, H. K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), F4-3.
- Lobban, C. S., & Harrison, P. J. (1994). *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press.

- Lopes, M.-A., Moraes, M. I., & Wilcox, R. (2020). Ganadería en el mundo americano: algunas reflexiones sobre tecnología, consumo e intercambio. *Mundo Agrario*, 21(46), 129.
- Macas Mendez, L. N., Ormaza González, F., & others. (2021). *Investigación de zonas aptas para el cultivo multi trófico integrado de Kappaphycus alvarezii y Crassostrea gigas en Santa Elena-Ecuador*. ESPOL. FIMCM.
- Mantri, V. A., Eswaran, K., Shanmugam, M., Ganesan, M., Veeragurunathan, V., Thiruppathi, S., Reddy, C. R. K., & Seth, A. (2017). An appraisal on commercial farming of *Kappaphycus alvarezii* in India: success in diversification of livelihood and prospects. *Journal of Applied Phycology*, 29, 335–357.
- Meyers, S. P. (1998). Papel del carotenoide astaxantina en la nutrición de especies acuáticas. *Avances En Nutrición Acuicola*.
- Michael. Y.R., & Catriona. L.H (2019) Seaweed nutrient physiology: application of concepts to aquaculture and bioremediation, *Phycologia*, 58:5, 552-562,  
DOI:10.1080/00318884.2019.1622920
- Montúfar-Romero, M., Rincones-León, R. E., Cáceres-Farias, L. B., Espinoza-Vera, M. M., Avendaño, U., Cruz-Jaime, T., Cubillos, L., Ruiz, W., Revelo, W., & Lodeiros, C. (2023). Feasibility of aquaculture cultivation of elkhorn sea moss (*Kappaphycus alvarezii*) in a horizontal long line in the Tropical Eastern Pacific. *Scientific Reports*, 13(1), 14751.
- Murray, A. P., Rodriguez, S., Frontera, M. A., Tomas, M. A., & Mulet, M. C. (2004). Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (boiss.) Kuntze. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(7–8), 477–480.

Naciones Unidas. (2023, November 8). *Se espera que El Niño dure al menos hasta abril de 2024.*

<https://news.un.org/es/story/2023/11/1525507#:~:text=El%20Ni%C3%B1o%20se%20desarroll%C3%B3%20r%C3%A1pidamente,a%C3%B1o%20y%20enero%20de%202024.>

Ohno, M., Nang, H. Q. & Hirase, S. (1996) Cultivation and carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* in the waters of Vietnam. *J. Appl. Phycol.* 8, 431–437.

<https://doi.org/10.1007/bf02178588> (1996).

Othman, R., Amin, N. A., Sani, M. S. A., Fadzillah, N. A., & Jamaludin, M. A. (2018).

Carotenoid and chlorophyll profiles in five species of Malaysian seaweed as potential halal active pharmaceutical ingredient (API). *Int. J. Adv. Sci. Eng. Inf. Technol.*, 8(4–2), 1610–1616.

Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D., & Ramos, A. A. (2015). Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, 14, 91–98.

Ramos, R., & Gallardo, S. (2021). Capacidad de biofiltración de nutrientes y crecimiento de macroalgas utilizando efluentes generados en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de biología marina y oceanografía*, 56(1), 13-21.

Rendón, L., & Balcázar, J. L. (2016). Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC*, 19.

Rezende, P. C., Miranda, C., Fracalossi, D. M., Hayashi, L., Seiffert, W. Q., do Nascimento

Vieira, F., & Schleder, D. D. (2022). Brown seaweeds as a feed additive for *Litopenaeus*

vannamei reared in a biofloc system improved resistance to thermal stress and white spot disease. *Journal of Applied Phycology*, 34(5), 2603–2614.

Roque, B. M., Venegas, M., Kinley, R. D., De Nys, R., Duarte, T. L., Yang, X., & Kebreab, E. (2021). Red seaweed (*Asparagopsis taxiformis*) supplementation reduces enteric methane by over 80 percent in beef steers. *PLoS ONE*, 16(3 March).  
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0247820>

Rudi, M., Sukenda, S., Wahjuningrum, D., Pasaribu, W., & Hidayatullah, D. (2019). Seaweed extract of *Gracilaria verrucosa* as an antibacterial and treatment against *Vibrio harveyi* infection of *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, 18(2), 120–129.

Ruiz-Santiago, F. L., Ruiz-Velázquez, J. A., Hernán-Becerra, J. A., García-Jiménez, R., & Valadez-Villarreal, A. (2019). Extracción y cuantificación de clorofila en hojas comestibles del estado de Tabasco. *Revista Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 944–949.

Sampath-Wiley, P., Neefus, C. D., & Jahnke, L. S. (2008). Seasonal effects of sun exposure and emersion on intertidal seaweed physiology: fluctuations in antioxidant contents, photosynthetic pigments and photosynthetic efficiency in the red alga *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Rhodophyta, Bangiales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 361(2), 83–91.

Sepulveda, M. (2021, September 2). *La maricultura de la macroalga Kappaphycus alvarezii como apoyo al desarrollo social y económico en el Estado de Río de Janeiro - Brazil - AquaHoy*. <https://aquahoy.com/maricultura-macroalga-kappaphycus-alvarezii-desarrollo-social-economico-rio-janeiro-brazil/>

- Steinhagen, S., Enge, S., Cervin, G., Larsson, K., Edlund, U., Schmidt, A. E. M., Wahlström, N., Kollander, B., Pavia, H., & Undeland, I. (2022). Harvest time can affect the optimal yield and quality of sea lettuce (*Ulva fenestrata*) in a sustainable sea-based cultivation. *Frontiers in Marine Science*, *9*, 816890.
- Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2014). Plant growth regulators in seaweeds: occurrence, regulation and functions. In *Advances in botanical research* (Vol. 71, pp. 125–159). Elsevier.
- Suantika, G., Situmorang, M. L., Khakim, A., Wibowo, I., Aditiawati, P., Suryanarayan, S., Nori, S. S., Kumar, S., & Putri, F. (2018). Effect of red seaweed *Kappaphycus alvarezii* on growth, survival, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* in the nursery phase. *J Aquac Res Development*, *10*, 2155–9546.
- Sudhakar, M. P., Dharani, G., & Paramasivam, A. (2023). Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity potential of R-phycoerythrin extracted from *Gracilaria corticata* seaweed. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, *6*, 100352.
- Syam, R., & Trijuno, D. D. (2013). Content of carrageenan, chlorophyll a and carotenoid of *Kappaphycus alvarezii* cultivated in different seawater depth Laikang village, District of Mangarabombang, Takalar Regency. *J Appl Biotechn*, *2*, 1–9.
- Tan, S. P., O'Sullivan, L., Prieto, M. L., Gardiner, G. E., Lawlor, P. G., Leonard, F., Duggan, P., McLoughlin, P., & Hughes, H. (2012). Extraction and bioautographic-guided separation of antibacterial compounds from *Ulva lactuca*. *Journal of Applied Phycology*, *24*, 513–523.

- Tan, C.Y., Dodd, I.C., Chen, J.E. (2021) Regulation of algal and cyanobacterial auxin production, physiology, and application in agriculture: an overview. *J Appl Phycol* 33, 2995–3023. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02475-3>
- Tanna, B., Choudhary, B., & Mishra, A. (2018). Metabolite profiling, antioxidant, scavenging and anti-proliferative activities of selected tropical green seaweeds reveal the nutraceutical potential of *Caulerpa* spp. *Algal Research*, 36, 96–105.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Thomas, J. (2015). Investigation of seaweed extracts as a source of treatment against bacterial fish pathogen. *Aquaculture*, 448, 82–86.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Thomas, J. (2016). Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture*, 464, 529–536.
- Thirunavukkarasu, R., Pandiyan, P., Balaraman, D., Subaramaniyan, K., Edward Gnana Jothi, G. E., Manikkam, S., & Sadaiyappan, B. (2013). Isolation of bioactive compound from marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* (VA09) and characterisation by FTIR. *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(1), 26–33.
- Tibbetts, S. M., Milley, J. E., & Lall, S. P. (2016). Nutritional quality of some wild and cultivated seaweeds: Nutrient composition, total phenolic content and in vitro digestibility. *Journal of Applied Phycology*, 28(6), 3575–3585. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0863-y>
- Torres, G., & Jiménez, J. (2022). *Diagnóstico de la maricultura en Ecuador: oportunidades y desafíos*. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.8411400>

Van Haesebroeck, J. (2022). *THE IMPACT OF INDOLE-3-ACETIC ACID ON VIRULENCE OF PATHOGENIC VIBRIOS*. Ghent University.

World Bank Group. (2016). Seaweed Aquaculture for Food Security, Income Generation and Environmental Health in Tropical Developing Countries. *Seaweed Aquaculture for Food Security, Income Generation and Environmental Health in Tropical Developing Countries*. <https://doi.org/10.1596/24919>

Xu, Z., Zou, D., & Gao, K. (2010). Effects of elevated CO<sub>2</sub> and phosphorus supply on growth, photosynthesis and nutrient uptake in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta).

Yong, Y. S., Yong, W. T. L. & Anton, A. (2013) Analysis of formulae for determination of seaweed growth rate. *J. Appl. Phycol.* 25, 1831–1834. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0022-7>

Yokoya, N. S., Stirk, W. A., Van Staden, J., Novák, O., Turečková, V., Pěnčík, A., & Strnad, M. (2010). ENDOGENOUS CYTOKININS, AUXINS, AND ABSCISIC ACID IN RED ALGAE FROM BRAZIL 1. *Journal of Phycology*, 46(6), 1198–1205.

Zainuddin, E. N., Tassakka, A. C. M., Manggau, M., & Syamsuddin, R. (2020). Preliminary study of cultivated algae from South Sulawesi as antibacterial agent against fish pathogenic bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 564(1), 012060.