

UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

REPÚBLICA DEL ECUADOR

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

FACULTAD DE POSGRADO

INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGIA

TEMA:

PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE AZOLLA BAJO UN SISTEMA DE REACTORES Y
DETERMINACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS

Autores:

Jaime David Sevilla Carrasco

Alex Edwin Guillen Bonilla

Director:

Mv. Vera Rodríguez José Humberto., Mg.

Milagro, 2024

Derechos de autor

Sr. Dr.

Fabricio Guevara Viejó

Rector de la Universidad Estatal de Milagro
Presente.

Nosotros, **Jaime David Sevilla Carrasco** y **Alex Edwin Guillen Bonilla** en calidad de autores y titulares de los derechos morales y patrimoniales de este informe de investigación, mediante el presente documento, libre y voluntariamente cedo los derechos de Autor de este proyecto de desarrollo, que fue realizada como requisito previo para la obtención de nuestro Grado, de Magisteren Biotecnología, como aporte a la Línea de Investigación **Agrobiotecnología** de conformidad con el Art. 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, concedemos a favor de la Universidad Estatal de Milagro una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos. Conservamos a nuestro favor todos los derechos de autores sobre la obra, establecidos en la normativa citada.

Así mismo, autorizamos a la Universidad Estatal de Milagro para que realice la digitalización y publicación de este Informe de Investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Los autores declaran que la obra objeto de la presente autorización es original en su forma de expresión y no infringe el derecho de autor de terceros, asumiendo la responsabilidad por cualquier reclamación que pudiera presentarse por esta causa y liberando a la Universidad de toda responsabilidad.

Milagro, 28 de septiembre de 2024



Firmado electrónicamente por:
**JAIME DAVID SEVILLA
CARRASCO**

Jaime David Sevilla Carrasco

CI: 0940126477



Firmado electrónicamente por:
**ALEX EDWIN GUILLEN
BONILLA**

Alex Edwin Guillen Bonilla

CI: 0910330182

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **ING. GUILLEN BONILLA ALEX EDWIN**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE AZOLLA BAJO UN SISTEMA DE REACTORES Y DETERMINACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	40.00
PROMEDIO	98.00
EQUIVALENTE	Excelente



Firma digitalizada por:
**DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO**

Mgs. **BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY**
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



Firma digitalizada por:
**MARCELA MARICELA
CARPIO ARIAS**

Msc. **CARPIO ARIAS MARCELA MARICELA**
VOCAL



Firma digitalizada por:
**CESAR ANIBAL
BARZOLA GAIBOR**

Ing. **BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL**
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE POSGRADO
CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

El TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**, presentado por **SEVILLA CARRASCO JAIME DAVID**, otorga al presente proyecto de investigación denominado "PRODUCCIÓN OPTIMIZADA DE AZOLLA BAJO UN SISTEMA DE REACTORES Y DETERMINACIÓN DE SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS", las siguientes calificaciones:

TRABAJO ESCRITO	58.00
SUSTENTACIÓN	39.33
PROMEDIO	97.33
EQUIVALENTE	Excelente



DIEGO GEOVANNY
BARZALLO GRANIZO

Mgs. BARZALLO GRANIZO DIEGO GEOVANNY
PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL



MARCELA MARICELA
CARIPIO ARIAS

Msc. CARIPIO ARIAS MARCELA MARICELA
VOCAL



CESAR ANIBAL
BARZOLA GAIBOR

Ing. BARZOLA GAIBOR CESAR ANIBAL
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, a mi hermosa familia y a todas aquellas personas que me han acompañado durante mi proceso de formación como persona y profesional.

Jaime David Sevilla Carrasco

DEDICATORIA

Dedico este trabajo con amor y gratitud, A mis padres, por su sacrificio y apoyo incondicional. A mi esposa e hijos, por su amor y motivación constante. A mis hermanos y a todos aquellos que buscan conocimiento y verdad.

Alex Edwin Guillen Bonilla

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a Dios y a la vida por permitirme concluir uno de mis objetivos en mi proceso de formación profesional.

A mis amados padres Roque y Carmen quienes con su ejemplo de lucha y perseverancia me han inculcado seguir adelante y dar lo mejor de mí. A mi querida hermana Gissela quien siempre me ha apoyado incondicionalmente durante cada etapa de mi vida. A mis tíos, tías, mi mami Alicia (†), mi abuelito Jaime (†), mi abuelita Olga. A mi querida Karen Melina por estar siempre presente en cada momento importante de forma incondicional. A mi querido amigo y compañero Iván C. por sus buenos consejos.

A nuestro tutor Humberto que estuvo en cada etapa del desarrollo de este trabajo y con su guía y buenos consejos constantemente nos impulsó a continuar y no decaer.

A todos los excelentes profesores que pertenecen a mi querida Universidad Estatal de Milagro, agradecerles infinitamente por su apoyo, dedicación y paciencia de forma incondicional para ayudarnos a crecer como grandes personas y profesionales.

Con mucho cariño

Jaime David Sevilla Carrasco

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por haber hecho posible este logro: a mis padres, Luis y Elba, por su amor incondicional, apoyo y sacrificios. Su dedicación y esfuerzo han sido la base de mi educación y formación. Gracias por creer en mí y por estar siempre presente. A mi esposa, Kerly, por su paciencia, comprensión, amor y apoyo constante. Tu amor y compañía han sido mi fuente de inspiración y motivación. Gracias por ser mi compañera en este camino. A mis hijos, Denisse, Andrés y Sebastián, porque ellos son mi fuente de inspiración y amor constante por recordarme la importancia de seguir adelante. Su presencia ha iluminado momentos difíciles y me ha recordado la importancia de la familia. Gracias por ser mi motivación para trabajar hacia un futuro mejor. A mis hermanos que aunque no esten cerca de mí los extraño profundamente gracias por su apoyo y por sus palabras de aliento.

A Msc. Humberto, por su guía y orientación experta. Su conocimiento y experiencia han enriquecido significativamente este trabajo.

A la Universidad Estatal de Milagro, por proporcionarme una formación académica excelente y oportunidades de crecimiento. Agradezco a sus profesores y personal por su dedicación y apoyo.

Este trabajo es un tributo a la perseverancia, el amor y el apoyo de mi familia y seres queridos. Espero que sirva como un ejemplo de que, con dedicación y esfuerzo, se pueden alcanzar grandes metas.

Con mucho afecto

Alex Edwin Guillen Bonilla

Resumen

El objetivo del estudio fue desarrollar un método eficiente para producir *Azolla filiculoides* en reactores, maximizando la obtención de sus compuestos bioactivos. El estudio fue de tipo experimental y descriptivo. Se utilizó la cepa *Azolla filiculoides*, inoculada en cada reactor con una densidad inicial de 0.10 g/L, se dispuso de 12 reactores de vidrio de 5 L para evaluar el impacto del volumen en la producción de biomasa fresca cada 5 días durante 30 días y calcular la tasa de crecimiento relativa (RGR). Los tratamientos aplicados fueron 3 soluciones nutritivas (Solución de Hoagland; Medio Murashige & Skoog y Fitohormonas), cada tratamiento estuvo compuesto por 4 réplicas. Se determinó la solución nutritiva óptima para su producción en reactores y se realizó un análisis fitoquímico para cuantificar los compuestos bioactivos (Fenoles totales, flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos). Las condiciones de cultivo fueron: pH 7.0; Temperatura 25 - 28 °C y una intensidad de luz de 150 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ durante 12 horas al día. Se utilizó métodos de extracción convencionales para obtener compuestos bioactivos de *Azolla* (Maceración y Soxhlet). Se empleó un diseño completamente al azar, bajo un análisis de varianza simple, la comparación de medias según prueba post-hoc (Tukey HSD) con probabilidad de error del 0.05%. Los datos obtenidos fueron tabulados utilizando el software estadístico SPSS. El tratamiento con Fitohormonas resultó ser el más efectivo, con valores de biomasa a los 30 días de 0.83 g/L, aunque el análisis estadístico confirma que no hay diferencias significativas entre los tratamientos para el análisis de varianza y prueba Tukey HSD. El análisis de los compuestos bioactivos describe que el tratamiento con Fitohormonas fue el más promisorio para la producción de *A. filiculoides*, presentando niveles más altos de fenoles totales (17.6 mg/g), flavonoides (16.1 mg/g), alcaloides (4.1 mg/g), saponinas (6.3 mg/g) y taninos (9.1 mg/g). Concluyendo que el tratamiento con fitohormonas es el más efectivo tanto para maximizar el crecimiento de biomasa como para aumentar la producción de compuestos bioactivos en *A. filiculoides*, destacándose por su alto contenido de compuestos bioactivos. Esto la posiciona como una opción óptima para aplicaciones agrícolas y médicas.

Palabras Clave: Compuesto bioactivo, extracción, optimización, reactor.

Abstract

The aim of the study was to develop an efficient method to produce *Azolla filiculoides* in reactors, maximizing the production of its bioactive compounds. The study was experimental and descriptive. The *Azolla filiculoides* strain was used, inoculated in each reactor with an initial density of 0.10 g/L. Twelve 5-L glass reactors were used to evaluate the impact of volume on fresh biomass production every 5 days for 30 days and to calculate the relative growth rate (RGR). The treatments applied were 3 nutrient solutions (Hoagland Solution; Murashige & Skoog Medium and Phytohormones), each treatment consisted of 4 replicates. The optimal nutrient solution for its production in reactors was determined and a phytochemical analysis was performed to quantify the bioactive compounds (total phenols, flavonoids, alkaloids, saponins and tannins). The culture conditions were: pH 7.0; Temperature 25 - 28 °C and a light intensity of 150 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ for 12 hours a day. Conventional extraction methods were used to obtain bioactive compounds from *Azolla* (Maceration and Soxhlet). A completely randomized design was used, under a simple analysis of variance, the comparison of means according to the post-hoc test (Tukey HSD) with a probability of error of 0.05%. The data obtained were tabulated using the statistical software SPSS. Treatment with Phytohormones turned out to be the most effective, with biomass values at 30 days of 0.83 g/L, although the statistical analysis confirms that there are no significant differences between the treatments for the analysis of variance and Tukey HSD test. The analysis of bioactive compounds describes that the treatment with phytohormones was the most promising for the production of *A. filiculoides*, presenting higher levels of total phenols (17.6 mg/g), flavonoids (16.1 mg/g), alkaloids (4.1 mg/g), saponins (6.3 mg/g) and tannins (9.1 mg/g). Concluding that the treatment with phytohormones is the most effective both to maximize biomass growth and to increase the production of bioactive compounds in *A. filiculoides*, standing out for its high content of bioactive compounds. This positions it as an optimal option for agricultural and medical applications.

Keywords: Bioactive compound, extraction, optimization, reactor.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Diagrama esquemático del reactor 15
- Figura 2.** Crecimiento de biomasa de *A. filiculoides* como respuesta al tratamiento de tres diferentes medios de cultivo durante un periodo de 30 días. 35

Lista de Tablas

Tabla 1. Tabla de operacionalización de variables.	4
Tabla 2. Taxonomía de la Azolla	20
Tabla 3. Distribución de tratamientos y replicas.	27
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA)	36
Tabla 5. Tukey HSD	37
Tabla 6. Resultados de los compuestos bioactivos	38

Índice /Sumario

Derechos de autor.....	II
Aprobación del director del Trabajo de Titulación	III
DEDICATORIA	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS.....	VII
AGRADECIMIENTOS.....	VIII
Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de Figuras	XI
Lista de Tablas.....	XII
Índice /Sumario.....	XIII
Introducción	1
Capítulo I: El problema de la investigación.....	2
1.1 Planteamiento del problema	2
1.2 Delimitación del problema.....	2
1.3 Formulación del problema.....	2
1.4 Preguntas de investigación	2
1.5 Determinación del tema	3
1.6 Objetivo general.....	3
1.7 Objetivos específicos	3
1.8 Hipótesis	3
1.9 Declaración de las variables (operacionalización).....	4
1.10 Justificación	4
1.11 Alcance y limitaciones.....	6
1.11.1. Alcance.....	6

1.11.2. Limitaciones.....	7
CAPÍTULO II: Marco teórico referencial	10
2.1 Antecedentes	10
2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación	12
2.2.1. Reactores	12
2.2.1.1. Concepto	12
2.2.1.2. Tipos.....	13
2.2.1.3. Diseño y construcción de reactores para el cultivo de Azolla	15
2.2.1.4. Aplicaciones en la producción de compuestos bioactivos	17
2.2.2. Azolla.....	18
2.2.2.1. Características botánicas	18
2.2.2.2. Usos	19
2.2.2.3. Taxonomía	20
2.2.2.4. Propiedades bioactivas.....	20
2.2.3. Producción de Azolla bajo condiciones controladas	21
2.2.4. Métodos de extracción de los compuestos bioactivos	22
2.2.5. Tamizaje fitoquímico	23
2.2.6. Aprovechamiento de los compuestos bioactivos en la industria	24
CAPÍTULO III: Diseño metodológico	27
3.1 Tipo y diseño de investigación	27
3.2 La población y la muestra	28
3.2.1 Procesamiento de la muestra	28
3.3 Los métodos y las técnicas	33
3.4 Procesamiento estadístico de la información	34
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados.....	35
4.1 Análisis e interpretación de los resultados	35
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones	40

5.1 Conclusiones.....	40
5.2 Recomendaciones	41
Bibliografía.....	42
Anexos.....	49
.....	57

Introducción

La Azolla es una planta acuática flotante que ha despertado un creciente interés en la comunidad científica debido a su potencial como fuente de compuestos bioactivos con aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y agrícola (Korsa et al., 2024). Estos compuestos han demostrado ser efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades y como aditivos en la alimentación animal (Nasir et al., 2022). En un estudio sobre las posibles aplicaciones de la Azolla, Korsa et al., (2024) enfatiza que, su producción a gran escala ha sido limitada debido a los desafíos asociados con el cultivo de Azolla en condiciones controladas.

El desarrollo de sistemas de reactores ofrece múltiples ventajas en comparación con los métodos convencionales de cultivo de Azolla (Hernández-Melchor et al., 2019). Estos sistemas permiten un control preciso de las condiciones de cultivo, como la temperatura, luz, concentración de nutrientes y el pH, lo que favorece el crecimiento óptimo de la planta y la acumulación de compuestos bioactivos (Khodadad Hosseini et al., 2021).

Además, los reactores ofrecen la posibilidad de escalar la producción de Azolla de manera eficiente, lo que resulta fundamental para satisfacer la demanda creciente de compuestos bioactivos en diferentes industrias (Ashok et al., 2017). Esto implica la implementación de estrategias de ingeniería y diseño que permitan maximizar la productividad y minimizar los costos de producción (Ahamed & Vermette, 2008).

Para lograr estos objetivos, se requiere un enfoque multidisciplinario que integre conocimientos de biología vegetal, microbiología, ingeniería de cultivos y biotecnología (Ramírez et al., 2020). De esta manera Ahamed & Vermette, (2008) establecen que, esto permitirá diseñar y optimizar los sistemas de reactores, así como desarrollar estrategias de cultivo y extracción de compuestos bioactivos.

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo principal desarrollar un método eficiente para la producción de Azolla en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta. Se busca superar las limitaciones de los métodos tradicionales de cultivo, que dependen de factores ambientales variables y presentan baja productividad.

Capítulo I: El problema de la investigación

1.1 Planteamiento del problema

La demanda creciente de compuestos bioactivos de origen natural ha impulsado la investigación en cultivos sostenibles como Azolla. Sin embargo, la producción a gran escala enfrenta desafíos relacionados con la optimización de condiciones de cultivo y métodos de extracción (Wong-Paz et al., 2020). Este estudio plantea resolver estos problemas mediante el desarrollo de un método eficiente para la producción de Azolla en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos, contribuyendo así a la sostenibilidad y eficiencia en la producción biotecnológica.

1.2 Delimitación del problema

Este trabajo de investigación se centra en la necesidad de desarrollar un método eficiente para la producción de Azolla en reactores con el objetivo de mejorar la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta. Actualmente, la producción de Azolla y la extracción de sus compuestos bioactivos enfrentan desafíos técnicos y limitaciones que dificultan su aprovechamiento. Por tanto, es necesario investigar y desarrollar un método que permita esta optimización, lo que contribuirá al desarrollo de aplicaciones en la industria farmacéutica, alimenticia y en otros sectores relacionados con la salud y el bienestar humano.

1.3 Formulación del problema

¿Cómo se puede desarrollar un método eficiente para la producción de Azolla en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta?

1.4 Preguntas de investigación

¿Qué solución nutritiva será la óptima para la producción de Azolla en reactores?

¿Será ideal la condición de cultivo proporcionada en los reactores para optimizar el crecimiento de Azolla?

¿Qué tipos de compuestos bioactivos podrían encontrarse en la Azolla?

1.5 Determinación del tema

El tema de estudio propuesto es " *Producción optimizada de Azolla bajo un sistema de reactores y determinación de sus compuestos bioactivos*", se centra en producir bajo condiciones controladas Azolla bajo sistemas de reactores para optimizar la obtención de sus compuestos bioactivos.

La investigación se enfoca en el diseño y desarrollo de reactores que permitan cultivar Azolla de manera controlada y optimizada, con el objetivo de maximizar la producción de esta planta acuática y obtener compuestos bioactivos de interés. Los reactores son sistemas que proporcionan condiciones controladas de cultivo, como temperatura, pH, nutrientes y agitación, para favorecer el crecimiento y la producción de su biomasa.

El estudio también busca obtener compuestos bioactivos. Estos pueden tener propiedades beneficiosas para la salud humana, como actividad antioxidante u otras propiedades terapéuticas. La investigación también se centra en identificar los compuestos bioactivos presentes en Azolla.

1.6 Objetivo general

Desarrollar un método eficiente para la producción de *Azolla filiculoides* en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta.

1.7 Objetivos específicos

- ❖ Establecer la solución nutritiva óptima para la producción de *A. filiculoides* en reactores.
- ❖ Determinar la biomasa fresca de *A. filiculoides* a los 30 días mediante la tasa de crecimiento relativo.
- ❖ Cuantificar mediante análisis fitoquímico los compuestos bioactivos presente en la *A. filiculoides*.

1.8 Hipótesis

El desarrollo de un método eficiente para la producción de Azolla en

reactores mejorará la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta.

1.9 Declaración de las variables (operacionalización)

Se detalla en la tabla 1 el cuadro de operacionalización de variables

Tabla 1. Tabla de operacionalización de variables.

Variable independiente	Desarrollar un método eficiente para la producción de <i>A. filiculoides</i> en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta
Variable dependiente	<ul style="list-style-type: none">✓ Establecer la solución nutritiva óptima para la producción de <i>A. filiculoides</i> en reactores.✓ Determinar la biomasa fresca de <i>A. filiculoides</i> a los 30 días✓ Cuantificar mediante análisis fitoquímico los compuestos bioactivos presente en la <i>A. filiculoides</i>.

Fuente: Autores

1.10 Justificación

La producción de alimentos y la búsqueda de alternativas sostenibles son desafíos cruciales en la actualidad. La Azolla, un helecho acuático flotante, ha demostrado un gran potencial como cultivo de alto valor nutricional y económico. El desarrollo de sistemas de reactores se presenta como una oportunidad para maximizar la producción de Azolla de manera eficiente y sostenible.

El cultivo de Azolla en reactores ofrece numerosas ventajas en comparación con los métodos tradicionales de cultivo en estanques y crecimiento natural. Estos sistemas permiten un control preciso de las

condiciones de cultivo, como la temperatura, la luz, el pH y los nutrientes, lo que garantiza un crecimiento óptimo de la planta y la obtención de compuestos bioactivos de alta calidad.

La optimización de su producción es de gran interés debido a su potencial como fuente de compuestos bioactivos. Estos compuestos pueden tener aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y agrícola, entre otras. El desarrollo de sistemas de reactores permitirá obtener Azolla con concentraciones más altas de estos compuestos, lo que aumentará su valor y utilidad.

Los reactores también ofrecen la posibilidad de producir Azolla durante todo el año, sin verse afectados por las condiciones climáticas. Esto es especialmente importante en regiones donde el clima es variable o donde la disponibilidad de agua es limitada. El uso de reactores garantiza una producción continua y estable, lo que contribuye a la seguridad alimentaria y a la diversificación de cultivos.

Además de su potencial como cultivo de alto valor, también desempeña un papel importante en la mitigación del cambio climático. Esta planta tiene la capacidad de fijar grandes cantidades de dióxido de carbono atmosférico y nitrógeno, lo que la convierte en una herramienta valiosa en la lucha contra el calentamiento global.

La investigación sobre la producción de Azolla bajo sistemas de reactores también tiene un impacto social significativo, su cultivo puede ser una fuente de empleo y desarrollo económico en comunidades rurales, especialmente en áreas donde los recursos naturales son limitados. Además, la producción de compuestos bioactivos puede impulsar la industria local y promover la innovación tecnológica.

Con el desarrollo de esta investigación también se genera conocimientos científicos y tecnológicos relevantes. La investigación en esta área puede contribuir al avance de la biotecnología y la ingeniería de reactores, así como al desarrollo de nuevas estrategias de cultivo y producción sostenible.

1.11 Alcance y limitaciones

1.11.1. Alcance

La investigación propuesta se centra en la producción de Azolla bajo sistemas de reactores y la obtención de compuestos bioactivos. Azolla es una planta acuática flotante que se ha utilizado ampliamente en la agricultura debido a sus beneficios como fertilizante natural y fuente de nutrientes. Sin embargo, su producción a gran escala aún presenta desafíos que limitan su uso generalizado.

El objetivo principal de esta investigación es desarrollar un método eficiente para la producción de *A. filiculoides* en reactores que mejore la obtención de sus compuestos bioactivos presentes en la planta. Para lograr esto, se investigarán diferentes aspectos relacionados con el cultivo y la optimización de las condiciones de crecimiento de la planta. Esto incluirá la selección de una cepa de Azolla adecuada, la formulación de medios de cultivo óptimos y la evaluación de parámetros ambientales.

Además de la producción de Azolla, la investigación también se enfocará en la obtención de compuestos bioactivos a partir de esta planta. Se sabe que Azolla contiene una variedad de compuestos con propiedades beneficiosas para la salud humana y animal, como antioxidantes, antimicrobianos y antitumorales. Por lo tanto, mediante métodos de extracción y purificación de estos compuestos se conocerá que tipos de metabolitos están presente para su posterior aplicación en diferentes industrias, como la farmacéutica y la cosmética.

El alcance de esta investigación incluirá un estudio a nivel de laboratorio como a escala piloto. Se realizarán experimentos en condiciones controladas de laboratorio para evaluar diferentes variables y optimizar los parámetros de cultivo. Posteriormente, se llevarán a cabo pruebas a esta escala piloto para validar los resultados obtenidos y que en los posterior puedan ser evaluados a producción en gran escala.

Los resultados de esta investigación tendrán potenciales aplicaciones en diferentes sectores, como la agricultura, la medicina y la industria. Se

espera que los sistemas de reactores desarrollados permitan una producción más eficiente y sostenible de Azolla, lo que podría contribuir a la seguridad alimentaria y a la reducción de la dependencia de fertilizantes químicos. Asimismo, la obtención de compuestos bioactivos a partir de Azolla podría tener un impacto significativo en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos y cosméticos.

1.11.2. Limitaciones

- *Limitaciones tecnológicas:* El desarrollo de sistemas de reactores requiere tecnologías sofisticadas y costosas, lo que puede dificultar su implementación a gran escala.
- *Disponibilidad de recursos:* La producción optimizada de Azolla requiere una amplia disponibilidad de recursos como agua, nutrientes y energía, lo que puede ser un desafío en áreas con escasez de estos recursos.
- *Control de condiciones ambientales:* Los reactores necesitan mantener condiciones ambientales específicas, como temperatura, humedad y luz, para optimizar la producción de Azolla. Sin embargo, lograr un control preciso de estas condiciones puede resultar complicado y costoso.
- *Contaminación:* La presencia de contaminantes en el agua o el aire puede afectar negativamente el crecimiento y la calidad de Azolla, lo que puede limitar su producción en reactores.
- *Variabilidad genética:* La variabilidad genética de las poblaciones de Azolla puede influir en su rendimiento y en la producción de compuestos bioactivos. La falta de uniformidad genética puede dificultar la obtención de resultados consistentes y reproducibles.
- *Limitaciones en la obtención de compuestos bioactivos:* La extracción de compuestos bioactivos de Azolla puede ser un proceso complejo y costoso, lo que puede limitar su producción a gran escala.

- *Conocimiento limitado:* Aunque se han realizado investigaciones sobre Azolla y sus compuestos bioactivos, aún existen lagunas en nuestro conocimiento sobre su fisiología, metabolismo y aplicaciones de cálculos, lo que puede limitar el desarrollo de sistemas de reactores optimizados.
- *Regulaciones y normativas:* El desarrollo de sistemas de reactores para la producción de Azolla y compuestos bioactivos puede estar sujeto a regulaciones y normativas que limiten su implementación o que requieran de autorizaciones especiales.
- *Escalabilidad:* La optimización de la producción de Azolla en reactores a pequeña escala puede no ser directamente aplicable a una producción a gran escala. La escalabilidad puede ser un desafío y requerir ajustes en los sistemas y procesos.
- *Competencia con otros cultivos:* La producción de Azolla en reactores puede competir con otros cultivos alimentarios o industriales, lo que puede generar conflictos en el uso de recursos y limitar su expansión.
- *Costo económico:* El desarrollo y mantenimiento de sistemas de reactores puede requerir una inversión económica significativa, lo que puede ser una limitante para su implementación en regiones con recursos limitados.
- *Sostenibilidad ambiental:* La producción en reactores debe ser ambientalmente sostenible y no generar impactos negativos en los ecosistemas circundantes. Garantizar la sostenibilidad puede requerir tecnologías adicionales y medidas de mitigación que aumenten los costos y la complejidad del sistema.
- *Interacción con otras especies:* El cultivo de Azolla en reactores puede generar interacciones con otras especies, como plagas o microorganismos, que pueden afectar su crecimiento y calidad. Controlar y prevenir estas interacciones puede ser un desafío.

- *Aceptación y adopción:* La implementación de sistemas de reactores para la producción de Azolla y compuestos bioactivos puede enfrentar resistencia o falta de aceptación por parte de los actores involucrados, lo que puede limitar su adopción y desarrollo.
- *Viabilidad económica:* La producción de Azolla y compuestos bioactivos en reactores debe ser económicamente viable para ser sostenible a largo plazo. La rentabilidad del sistema puede depender de factores como el precio de mercado de los productos, los costos de producción y la demanda del mercado.

CAPÍTULO II: Marco teórico referencial

2.1 Antecedentes

La Azolla es un helecho acuático que crece naturalmente en ríos, estanques, canales y arrozales con aguas estancadas, requiere de grandes cantidades de agua debido a su alta densidad de producción (Khodadad Hosseini et al., 2021).

En los últimos años, el campo de la bioquímica se está actualizando para incorporar los avances en la ampliación de diseños en mejoras de sistemas de reactores que podrán superar la mayoría de los miedos que aún están presentes, se espera que mejore los procesos para proporcionar una mayor capacidad y rendimiento especialmente para su uso en la industria alimentaria y farmacéutica utilizados a nivel industrial (Ashok et al., 2017).

Los reactores como sistemas optimizan las condiciones del cultivo para favorecer la generación de biomasa y metabolitos, a la vez se debe proporcionar las condiciones necesarias como pH, humedad, nutrientes, presión, temperatura, etc., para garantizar la estabilidad del proceso (Ramírez et al., 2020).

Los hallazgos actuales indican que la Azolla es una rica fuente de proteínas, lo que tiene un claro beneficio al compensar una parte de las necesidades nutricionales de la producción animal (ganado, avícola y pesquera) efectivamente un suplemento dietético de bajo costo, además es considerada biocontrolador de mosquitos, posee propiedades repelente, efectiva en la biorremediación ambiental, tiene capacidad biofertilizante, secuestra carbono del CO₂ y bioenergía para las necesidades potenciales de la propia planta de Azolla (Korsa et al., 2024).

La planta de Azolla posee una simbiosis asociada con bacterias fijadoras de nitrógeno, como es el caso de la *Azolla anabaena*, esta bacteria utiliza la energía de la fotosíntesis de la planta de Azolla para fijar el nitrógeno atmosférico, lo que contribuye a la producción de compuestos nitrogenados en la planta, además posee antocianinas que le da la pigmentación a sus hojas que pueden ser de color verde, azul o rojo (Peters & Mayne, 1974).

La especie *Azolla filiculoides* es una asociación simbiótica entre la planta acuática Azolla y la cianobacterias (Abd El-Aal, 2022). Esta asociación es de gran interés debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, lo que la convierte en una fuente natural de nitrógeno muy importante en la agricultura (Rodríguez et al., 2024). Se ha demostrado que esta asociación puede fijar entre 100 a 150 kg de N₂ atmosférico por hectárea/año en aproximadamente 40-60 toneladas de biomasa (González-Salazar & Barahona-Amores, 2023). Además, la Azolla contiene aproximadamente 23.8% de proteína cruda, 4.4% de grasa, 6.4% de almidón y 9.5% de fibra (Mancilla Castro & Pérez Román, 2022).

El uso de la Azolla como bioabono en cultivos agrícolas ha mostrado resultados significantes, se ha observado que la aplicación de Azolla en el cultivo de arroz puede tener efectos biofertilizantes, mejorando el crecimiento y rendimiento de las plantas (Castro et al., 2002). Esto se debe a la capacidad de la *A. filiculoides* para proporcionar nitrógeno y otros nutrientes esenciales a las plantas, lo que puede reducir la necesidad de fertilizantes químicos y promover prácticas agrícolas más sostenibles.

Además de su uso como bioabono, la Azolla también ha despertado interés en otros campos de investigación. Por ejemplo, se ha estudiado su potencial como fuente de alimento para animales, debido a su alto contenido de proteínas y otros nutrientes (Méndez-Martínez et al., 2018). También se ha investigado su uso en la remediación de aguas

contaminadas, ya que la Azolla puede absorber y acumular metales pesados y otros contaminantes del agua.

La *A. filiculoides* ha sido objeto de varios estudios que han investigado los metabolitos secundarios presentes en esta planta acuática (Freire et al., 2016). Se ha encontrado que la Azolla contiene una variedad de metabolitos secundarios, incluyendo taninos hidrolizados, esteroides, fenoles y alcaloides (Pabón & Hernández-Rodríguez, 2012). Estos metabolitos secundarios pueden tener diversos efectos biológicos y propiedades nutricionales.

Estos metabolitos secundarios pueden tener propiedades antioxidantes, antimicrobianas y otros efectos biológicos beneficiosos (Pérez Hernández et al., 2021). Sin embargo, es importante destacar que se requiere más investigación para comprender completamente las propiedades y los efectos de estos metabolitos secundarios en la Azolla. En términos de su aplicación industrial, los metabolitos secundarios de la Azolla pueden tener potencial en diversas industrias, como la alimentaria, farmacéutica y cosmética (Trejo-Márquez et al., 2015). Por ejemplo, los fenoles y esteroides presentes en la Azolla pueden tener propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que los hace interesantes para la formulación de productos cosméticos y productos para el cuidado de la piel.

2.2 Contenido teórico que fundamenta la investigación

2.2.1. Reactores

2.2.1.1. Concepto

Los reactores también se conocen como recipientes o sistemas de cultivo con condiciones controladas y óptimas para el desarrollo de microorganismos, células vegetales o animales (Garcinuño & Álvarez, 2023).

Estos dispositivos permiten la conversión de materias primas en productos mediante la multiplicación de células y/o microorganismos como hongos, levaduras y bacterias. Además, se emplean en la fabricación de medicamentos, cerveza, biofertilizantes y en la producción de enzimas utilizadas en diferentes industrias. La clave es la conversión de la biomasa en varias corrientes de productos y la integración de varios procesos y tecnologías de manera sostenible (Cárdenas-Ortiz et al., 2022).

2.2.1.2. Tipos

Existen varios tipos de reactores utilizados en aplicaciones de fermentación inteligente y microbiología aplicada. Cabe destacar que la selección del tipo de reactor depende de la aplicación específica y de las necesidades del proceso (Garcinuño & Álvarez, 2023).

El mismo autor manifiesta que, cada tipo de reactor tiene sus propias ventajas y desventajas, y es importante comprender sus características y modos de funcionamiento para una implementación eficaz. A continuación, analizaremos algunos de los tipos más comunes:

Reactores de tipo Tanque Agitado: Estos reactores son comúnmente cilíndricos y varían en tamaño desde litros hasta metros cúbicos. Por lo general, están hechos de acero inoxidable. Son utilizados para el cultivo de células o tejidos en el contexto de la cultura celular. También se utilizan en ingeniería de tejidos o ingeniería

bioquímica/bioprosesos. La inmovilización es un término general que describe una amplia variedad de métodos para la fijación o atrapamiento de células o partículas.

Esto se aplica a todos los tipos de biocatálisis, incluyendo enzimas, organelos celulares, células y órganos animales y vegetales. La inmovilización es útil para procesos operados de forma continua, ya que los organismos no se eliminarán con el efluente del reactor, pero está limitada en escala debido a que los microorganismos solo están presentes en las superficies del recipiente.

Reactores de Fermentación: Estos reactores se utilizan principalmente en la producción de microorganismos para alimentos y bebidas. Permiten controlar y optimizar las condiciones de cultivo para el crecimiento de microorganismos y la producción de compuestos deseables. Existen diferentes tipos de reactores de fermentación, como los reactores de tanque agitado, los reactores de lecho fluidizado y los reactores de lecho compacto.

Cada tipo tiene sus propias características y aplicaciones específicas. Por ejemplo, en los reactores de lecho fluidizado, las células son pequeñas partículas "inmovilizadas" que se mueven con el fluido, lo que permite una alta tasa de transferencia de oxígeno y nutrientes a las células. En cambio, en los reactores de lecho compacto, las células se inmovilizan sobre partículas grandes que no se mueven con el líquido.

presión hasta 180 psi, con insuflado de aire a presión para proveer el oxígeno necesario para el desarrollo de los microorganismos. El tambor es envuelto externamente con lana de vidrio para aislarlo térmicamente del exterior. Posee una válvula de seguridad para la presión, una línea de aire y otra de sensores hacia el centro del tambor, de tal manera que las mediciones se realizan en el centro de la masa y el aire se ingresa también desde el centro, llevando el proceso por la ruta aerobia.

Contiene trozos de madera con tamaños entre 2 y 4 cm para actuar como material abultante que ayudara a mantener la porosidad y estabilidad estructural de la masa, impidiendo fenómenos de colmatación y de anoxia, que podrían metanizar el proceso.

La rotación del tambor se llevó a cabo por medio de ruedas de fricción. El tambor descansa sobre cuatro ruedas, y a una de ellas se le acopló el eje de un motor capaz de hacer girar toda la masa. El accionamiento del compresor y los tiempos de rotación del tambor, se condicionaron según la evolución del compost dentro del reactor programando un microcontrolador Atmega 328 a través de una interfaz Arduino, capaz de procesar señales análogas y digitales tanto de entrada como de salida, y por medio de unos accionadores se controló el motor y el compresor. Teniendo en cuenta que a la laguna no llega la red eléctrica convencional, la energía eléctrica de todo el sistema electromecánico y de sensores se suministró por medio de un sistema fotovoltaico, adecuadamente dimensionado para las

condiciones climáticas de la laguna, con una autonomía de dos días.

El reactor se dotó de sensores de temperatura, concentración de Oxígeno y contenido de humedad, que muestrean tres veces por día durante un mes y envían los datos recogidos al datalogger. La información la organiza, gráfica y analiza recogida con ayuda del software Statgraphics Centurion.

2.2.1.4. Aplicaciones en la producción de compuestos bioactivos

Los reactores son una herramienta eficaz para la producción masiva de células o compuestos bioactivos, ya que permiten el cultivo y crecimiento controlado de microorganismos como bacterias, hongos, levaduras, células vegetales y animales (Alanoca Quispe, 2023).

Estos microorganismos pueden ser utilizados para la producción de una amplia variedad de compuestos bioactivos, como enzimas, antioxidantes, biopesticidas, biofertilizantes, entre otros, esta idea constituye una extensión de lo propuesto por Alanoca Quispe, (2023).

Como bien afirma Garcinuño & Álvarez, (2023), la utilización de reactores en la producción de compuestos bioactivos ofrece varias ventajas. Por un lado, permite la producción masiva y controlada de estos compuestos, lo que facilita su obtención en grandes cantidades. Además, los reactores permiten optimizar el proceso de producción al controlar parámetros como la temperatura, pH, oxigenación, concentración de gases, presión y agitación, creando un ambiente ideal

para el crecimiento de los microorganismos y la producción de compuestos bioactivos.

2.2.2. Azolla

2.2.2.1. Características botánicas

De esta manera Méndez-Martínez et al., (2018) afirman que, la Azolla es un género de helechos acuáticos que pertenece a la familia *Azollaceae*. Presentan las siguientes características botánicas:

- ✓ Planta acuática flotante que se encuentra en cuerpos de agua dulce con poco movimiento.
- ✓ Son pequeñas, generalmente solo miden unos pocos centímetros de diámetro, pero crecen rápidamente y pueden formar grandes matas.
- ✓ Las hojas son pequeñas y están divididas, y su color puede variar desde rojo y púrpura a pleno sol, hasta verde pálido o verde azulado en la sombra.
- ✓ No presenta flores ni semillas, sino que se reproduce a través de esporas y, en el caso de la especie *Azolla filiculoides*, también puede reproducirse mediante la división de sus tallos secundarios más desarrollados.
- ✓ La Azolla forma una asociación simbiótica con una cianobacteria llamada *Anabaena azollae*, que le permite fijar nitrógeno del aire.
- ✓ Es una planta acuática de rápido crecimiento, lo que la convierte en una opción atractiva para embellecer estanques y acuarios.

- ✓ Es importante tener en cuenta que la Azolla puede convertirse en una especie invasora y agresiva en ciertos países, por lo que su introducción en el medio ambiente está prohibida en algunos lugares.

2.2.2.2. Usos

Uso en la agricultura: La Azolla se utiliza como biofertilizante en el cultivo de arroz. Se ha demostrado que mejora la calidad del suelo y reduce los costos de cultivo del arroz. Además, la Azolla se puede utilizar como una capa de mulch para suprimir las malas hierbas en los cultivos de arroz.

Uso en la alimentación animal: La Azolla se utiliza como alimento en la nutrición animal ya sea de aves, cerdos, bovinos y peces. Varios estudios han demostrado que la tiene una buena influencia en el rendimiento del crecimiento animal. También se ha estudiado su potencial como una alternativa sostenible en la alimentación animal, contribuyendo a sistemas alimentarios saludables y al medio ambiente.

Otros usos: La Azolla también se ha utilizado como una planta ornamental en áreas de altas latitudes donde no puede establecerse firmemente como una maleza. Además, se ha investigado su uso como biorremediador para mejorar la calidad del agua y del suelo.

Es importante tener en cuenta que la Azolla no puede sobrevivir en inviernos con temperaturas prolongadas bajo cero y no tolera la salinidad.

2.2.2.3. Taxonomía

Según la base de datos del NCBI la nomenclatura de clasificación taxonómica de la Azolla se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Taxonomía de la Azolla.

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Reino	<i>Viridiplantae</i>
Filo	<i>Streptophyta</i>
Subdivision	<i>Streptophytina</i>
Division	<i>Embryophyta</i>
Clase	<i>Polypodiopsida</i>
Subclase	<i>Polypodiidae</i>
Orden	<i>Salviniales</i>
Familia	<i>Azollaceae/Salviniaceae</i>
Genero	<i>Azolla</i>

Fuente: (Schoch CL., 2020)

2.2.2.4. Propiedades bioactivas

Un estudio efectuado por Carabalí Isajar, (2014) describe que los compuestos bioactivos presente en la Azolla dependerán del género en estudio, siendo así: *A. pinnata* (Flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, carbohidratos, saponinas y ácidos carboxílicos); *A. Microphylla* (Compuestos fenólicos, taninos, esteroides, triterpenoides, glicósidos de antraquinonas, azúcares y aminoácidos); *A. Filiculoides* (α y β clorofila,

carotenoides, xantofilas, compuestos fenólicos, alcoholes, aldehídos, alcanos, cetonas, terpenoides, saponina, isovitexin 7-O-glicósido, homoorientin, luteolin 6-C glicósido, 3-deoxiantocianina, glicósidos, luteolinidina y apigenina); *A. caroliniana* (glicósidos de 3-deoxiantocianina).

2.2.3. Producción de Azolla bajo condiciones controladas

La Azolla es una planta acuática de crecimiento rápido y reproducción eficiente, lo que la hace adecuada para su producción en condiciones controladas, una de las ventajas de la producción bajo condiciones controladas es su alta tasa de crecimiento, esta planta tiene una capacidad excepcional para duplicar su biomasa en tan solo dos o tres días, lo que la convierte en una fuente sostenible y eficiente de nutrientes para otros cultivos (Castro et al., 2003).

La producción de Azolla bajo condiciones controladas requiere un manejo adecuado de factores como la temperatura, la luz, el pH del agua y la disponibilidad de nutrientes (Espinoza & Gutierrez, 2006). Se han realizado estudios para determinar las condiciones óptimas de crecimiento de la Azolla, incluyendo el uso de sustratos sólidos o líquidos y la implementación de estructuras de protección como invernaderos, estos estudios han demostrado que el cultivo de Azolla bajo condiciones controladas puede ser exitoso y rentable (Armijos, 2005).

Otro aspecto importante de la producción de Azolla bajo condiciones controladas es su capacidad para producir compuestos bioactivos, se ha descubierto que la Azolla contiene una variedad de metabolitos secundarios, como fenoles y flavonoides, que tienen propiedades antioxidantes y

antimicrobianas (Freire et al., 2016).

En términos prácticos, la producción de *Azolla* bajo condiciones controladas requiere un manejo cuidadoso y preciso, es necesario controlar la temperatura del agua, la calidad de la luz y los niveles de nutrientes para garantizar un crecimiento saludable, además, es importante controlar la densidad de siembra y la renovación del agua para evitar problemas de contaminación o competencia con otras especies (Espinoza & Gutierrez, 2006).

2.2.4. Métodos de extracción de los compuestos bioactivos

Los métodos de extracción son esenciales para obtener los compuestos bioactivos presentes en las plantas. Estos compuestos, como los polifenoles, flavonoides y terpenoides, tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas, entre otras (Gámez-Villazana, 2020). La extracción permite separar estos compuestos de la matriz vegetal y concentrarlos para su posterior análisis y aplicación en diferentes industrias (Velasco et al., 2007).

Existen diferentes métodos de extracción utilizados en la obtención de compuestos bioactivos de plantas. Algunos de los métodos más comunes incluyen la maceración, la percolación, la extracción con solventes orgánicos, la extracción asistida por ultrasonido y la extracción con fluidos supercríticos (Moreno-Romero et al., 2022). Cada método tiene sus ventajas y desventajas en términos de eficiencia, selectividad y costo, por lo que es importante seleccionar el método más adecuado para cada tipo de planta y compuesto de interés.

La elección del solvente de extracción es crucial para obtener una alta eficiencia en la extracción de los compuestos bioactivos, los

solventes utilizados pueden ser polares, como el metanol o el etanol, o apolares, como el hexano o el éter, la polaridad del solvente debe ser compatible con la polaridad de los compuestos objetivo para lograr una extracción eficiente, además, es importante considerar la toxicidad y la disponibilidad de los solventes utilizados (Soto-García & Rosales-Castro, 2016).

Los avances en los métodos de extracción de compuestos bioactivos en plantas han permitido el desarrollo de técnicas más rápidas y eficientes. Por ejemplo, se han implementado métodos de extracción asistidos por tecnologías como la ultrasonografía y los fluidos supercríticos, que permiten una mayor extracción de compuestos en menos tiempo y con menor consumo de solventes, estos avances han facilitado la obtención de extractos de plantas con una mayor concentración de compuestos bioactivos (Velasco et al., 2007).

La extracción de compuestos bioactivos de plantas es solo el primer paso en su estudio y aplicación. Una vez obtenidos los extractos, es necesario realizar análisis químicos y biológicos para identificar y cuantificar los compuestos presentes, así como evaluar sus propiedades y actividades biológicas. Estos análisis incluyen técnicas como la cromatografía, la espectroscopía y los ensayos biológicos, estos estudios son fundamentales para comprender el potencial terapéutico y las aplicaciones de los compuestos bioactivos en diferentes campos, como la medicina, la alimentación y la cosmética (Torres-Aguirre et al., 2018).

2.2.5. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una herramienta fundamental en la investigación del potencial biológico y farmacológico de las plantas. Este enfoque permite identificar y analizar los metabolitos

secundarios presentes en las plantas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides y fenoles, entre otros (Quezada et al., 2021). Estos compuestos bioactivos tienen propiedades medicinales y pueden ser utilizados en el desarrollo de nuevos fármacos y productos naturales.

El objetivo principal del tamizaje fitoquímico es identificar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en las plantas. Para ello, se utilizan diferentes técnicas y reactivos químicos que permiten detectar la presencia de compuestos específicos, algunas de las pruebas más comunes incluyen el uso de reactivo de Shinoda para detectar flavonoides, el reactivo de Dragendorff para alcaloides y el reactivo de Ninhidrina para aminoácidos (Gualinga et al., 2024).

El tamizaje fitoquímico también puede incluir técnicas de cromatografía, como la cromatografía en capa delgada (CCD) o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que permiten separar y cuantificar los compuestos presentes en los extractos de plantas (Velasco et al., 2007). Estas técnicas son fundamentales para determinar la composición química de las plantas y evaluar su potencial actividad biológica.

Además de la identificación de compuestos bioactivos, el tamizaje fitoquímico también puede proporcionar información sobre las posibles acciones farmacológicas de los extractos de plantas. Al detectar la presencia de ciertos metabolitos secundarios, se pueden inferir propiedades como actividad antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatoria o anticancerígena, entre otras (Enríquez et al., 2024).

2.2.6. Aprovechamiento de los compuestos bioactivos en la industria

El aprovechamiento de los compuestos bioactivos de plantas en la industria es un tema de creciente interés debido a las propiedades medicinales y terapéuticas que estos compuestos pueden ofrecer (Radillo et al., 2023). Los avances en la investigación y desarrollo de productos naturales han abierto nuevas oportunidades para utilizar estos compuestos en diferentes sectores industriales, como la alimentación, la cosmética y la farmacéutica.

En el sector alimentario, los compuestos bioactivos de plantas pueden utilizarse como ingredientes funcionales en la formulación de productos saludables. Por ejemplo, los antioxidantes presentes en algunas plantas pueden ayudar a prevenir la oxidación de los alimentos y alargar su vida útil, además, los compuestos bioactivos pueden aportar beneficios para la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares o el fortalecimiento del sistema inmunológico (Pardo et al., 2023).

El mismo autor sostiene que en la industria cosmética, los compuestos bioactivos de plantas se utilizan en la formulación de productos para el cuidado de la piel, el cabello y las uñas. Estos compuestos pueden tener propiedades hidratantes, antioxidantes, antiinflamatorias y regenerativas, que contribuyen a mejorar la apariencia y salud de la piel y el cabello. Además, el uso de productos naturales con compuestos bioactivos es cada vez más valorado por los consumidores que buscan alternativas más saludables y sostenibles.

En el ámbito farmacéutico, los compuestos bioactivos de plantas han sido fuente de numerosos medicamentos y principios activos utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, la quinina obtenida de la corteza del árbol de la quina se ha utilizado para tratar la malaria durante siglos, otro ejemplo es el ácido salicílico, derivado de la corteza del sauce, que se utiliza en

la fabricación de aspirina (Pardo et al., 2023).

El aprovechamiento de los compuestos bioactivos de plantas en la industria también puede contribuir a la sostenibilidad y conservación del medio ambiente. Al utilizar recursos naturales renovables en lugar de compuestos sintéticos, se reduce la huella ecológica y se promueve un enfoque más respetuoso con el entorno.

CAPÍTULO III: Diseño metodológico

3.1 Tipo y diseño de investigación

El estudio es de tipo experimental y descriptivo, se efectuó en el laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias e Ingenierías (FACI) de la Universidad Estatal de Milagro (UNEMI).

Se dispuso de 12 reactores de vidrio de 5 L de capacidad bajo un sistema de flujo continuo. Se utilizaron tres tratamientos con diferentes medios de cultivo:

1. Solución de Hoagland 1mg/L (TRATAMIENTO 1)
2. Medio Murashige & Skoog (MS) 4g/L (TRATAMIENTO 2)
3. Fitohormonas (benzyloaminopurina y ácido indolacético, 1 mg/L de cada reactivo) (TRATAMIENTO 3)

Cada tratamiento estuvo compuesto por 4 réplicas (R1 a R4), con un total de 12 unidades experimentales, ver tabla 3.

Tabla 3. Distribución de tratamientos y replicas.

TRATAMIENTOS	REPLICAS			
T1	R1	R2	R3	R4
T2	R1	R2	R3	R4
T3	R1	R2	R3	R4

T1 (Hoagland); T2 (Murashige Skood); T3 (Fitohormonas)

Los tratamientos se llevaron a cabo en reactores temporales de vidrio de 5 litros, equipados con aeradores de 5L/min, que proporcionaron una oxigenación constante.

Las plantas se expusieron a luz indirecta y se mantuvieron a una temperatura controlada de 25-28°C.

3.2 La población y la muestra

Se utilizó una cepa la cual fue adquirida en viveros especializados de plantas acuáticas ubicados en La Maná, Ecuador, la misma que inmediatamente fue llevada al laboratorio y lavada con agua destilada para eliminar cualquier contaminante.

Posteriormente, las plantas fueron desinfectadas utilizando una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante 2 minutos, seguida de un enjuague con agua destilada estéril. Se sumergieron en una solución de antibióticos (estreptomicina y cloranfenicol, 100 mg/L) durante 15 minutos, para evitar contaminación bacteriana, y luego se enjuagaron con agua destilada estéril.

La densidad inicial de siembra fue de 0.1 g/L de biomasa fresca en cada reactor. Se controló el crecimiento de las plantas durante 30 días, con mediciones de biomasa cada 5 días.

Las condiciones de cultivo fueron: pH 7.0; Temperatura 25-28°C y una intensidad de luz de 150 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$ durante 12 horas al día. La oxigenación se dio mediante una bomba modelo (Power 200) 5L por minuto realizando circulación del agua para mantener niveles adecuados de oxígeno.

3.2.1 Procesamiento de la muestra

3.2.1.1. Biomasa de la Azolla

Las mediciones de biomasa fresca (g/L) se tomaron cada 5 días durante un período de 30 días, calculando:

Tasa de Crecimiento Relativa (RGR): Tasa de crecimiento relativo.

$$RGR(\%) = \left(\frac{\text{Biomasa final} - \text{Biomasa inicial}}{\text{Biomasa inicial}} \right) \times 100$$

Adicional se obtuvieron resultados de:

Tasa de Crecimiento Absoluto (AGR): Con la finalidad de indicar el cambio absoluto en la biomasa durante el período de tiempo del ensayo. Fue útil entender el crecimiento total, independientemente del tamaño inicial.

$$AGR = \left(\frac{\text{Biomasa final} - \text{Biomasa inicial}}{\text{Tiempo}} \right) =$$

Tasa de Duplicación (TD): Así mismo es necesario conocer el tiempo necesario para que la biomasa se duplique.

$$TD = \left(\frac{\ln(2)}{\text{Tasa de Crecimiento Relativo (RGR)}} \right) =$$

Eficiencia de Conversión de Biomasa (ECB): Nos permitió ver cuánta biomasa se ha convertido en relación con los nutrientes suministrado cada uno de los nutrientes dentro de sus contenidos se consideró su consumo de nitrógeno.

$$ECB = \left(\frac{\text{Biomasa obtenida}}{\text{Cantidad de nutrientes obtenidos}} \right) =$$

3.2.1.2. Análisis de los Compuestos Bioactivos

- **Extracción de Compuestos Bioactivos**

- Después del período de crecimiento, las plantas se secaron en horno a 50°C durante 48 horas.
- Las plantas secas se trituraron hasta obtener un polvo fino.
- Para la extracción de compuestos bioactivos, se utilizó etanol como solvente y se realizó una maceración de 24 horas.

- **Extracción Soxhlet por recirculación**

Tras la maceración previa del material vegetal en etanol, se realizó una extracción utilizando el equipo Soxhlet. Este proceso permitió extraer los compuestos solubles de la Azolla en el solvente etanol. Al finalizar, se obtuvo un extracto etanólico concentrado de Azolla, listo para someterse a análisis.

- **Análisis Químico de Compuestos Bioactivos**

- Se determinó el contenido de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu, midiendo la absorbancia a 765 nm.
- Para la cuantificación de flavonoides, se utilizó el método de Cloruro de Aluminio, midiendo la absorbancia a 415 nm.

3.2.1.2.1. Análisis Fitoquímico Detallado

- **Análisis de Fenoles Totales**

Método: Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu para determinar el contenido de fenoles totales.

Procedimiento:

- Se preparó una solución de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido al 10% (1:10 con agua destilada).
- Se tomaron 0.5 mL del extracto concentrado de Azolla y se mezclaron con 2.5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu.
- Se dejó reaccionar durante 5 minutos en la oscuridad.
- Posteriormente, se añadieron 2 mL de una solución de carbonato de sodio al 7.5%.
- La mezcla se incubó en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro

UV HACH.

Cálculo de Fenoles Totales: La cantidad de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de extracto seco), utilizando una curva de calibración de ácido gálico.

El análisis de fenoles totales se realiza utilizando el método de Folin-Ciocalteu. A partir de los valores de absorbancia obtenidos por el espectrofotómetro, se procede de la siguiente manera:

Paso a Paso:

- **Curva de Calibración:**

- Se preparó una curva de calibración con ácido gálico como estándar, con concentraciones conocidas (10, 20, 30, 40, 50 mg/L).
- Se midieron las absorbancias de cada concentración en el espectrofotómetro a 765 nm.
- Se generó una ecuación de la línea recta ($y = mx + b$), donde:
 - y es la absorbancia.
 - x es la concentración en mg/L.

- **Interpolación:**

- Se midió la absorbancia de la muestra de *Azolla filiculoides*.
- Utilizando la ecuación de la curva de calibración, se interpoló el valor de la absorbancia de la muestra para obtener la concentración en mg/L.

- **Análisis de Flavonoides**

Método: Se utilizó el método del Cloruro de Aluminio para la cuantificación de flavonoides.

Procedimiento:

- Se mezclaron 0.5 mL del extracto con 2 mL de una solución de Cloruro de Aluminio al 2%.
- La solución se dejó reaccionar durante 30 minutos en la oscuridad.
- Se midió la absorbancia a 415 nm en el espectrofotómetro UV HACH.
- Cálculo de Flavonoides: Los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/g de extracto seco), utilizando una curva de calibración de quercetina.
- El análisis de flavonoides sigue un proceso similar al de los fenoles, pero utilizando quercetina como estándar y midiendo la absorbancia a 415 nm.

- **Determinación de Alcaloides**

Precipitación de Alcaloides: Para la determinación de alcaloides, se utilizó un método de precipitación con ácido clorhídrico.

Procedimiento:

- Se tomó 1 mL del extracto concentrado de Azolla y se acidificó con HCl al 2%.
- Se agitó vigorosamente y se dejó reposar 15 minutos.
- Se observó la formación de un precipitado, que se filtró y

pesó para calcular el contenido de alcaloides.

- ***Determinación de Saponinas***

Formación de Espuma: Las saponinas se detectaron utilizando el método de formación de espuma.

Procedimiento:

- Se añadió 1 mL del extracto a un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada.
- Se agitó vigorosamente el tubo durante 30 segundos.
- Se dejó reposar 15 min. y se observó la formación de una capa estable de espuma, indica la presencia de saponinas.

- ***Determinación de Taninos***

Reacción con Gelatina: Los taninos se cuantificaron mediante la reacción con gelatina.

Procedimiento:

- Preparar una solución de gelatina al 1% en agua destilada.
- Se mezclaron 2 mL del extracto con 2 mL de la solución de gelatina y se dejó reaccionar por 10 minutos.
- Se observó la formación de un precipitado que indica la presencia de taninos.
- El contenido de taninos se expresó en equivalentes de ácido tánico (mg/g de extracto seco).

3.3 Los métodos y las técnicas

Para el desarrollo de la investigación se procedió a la utilización de técnicas investigativas como la experimentación, observación, muestreos

aleatorios y búsqueda bibliográfica a partir de fuentes primarias como artículos científicos. A demás, para seguir una sistemática, racional y objetiva dentro del estudio la recopilación de datos se efectuó bajo métodos cuantitativos y cualitativos.

3.4 Procesamiento estadístico de la información.

Para el análisis de los datos recopilados se empleó un diseño completamente al azar DCA. Se aplicó un análisis de varianza simple ANOVA y para determinar la significancia de las diferencias entre los tratamientos se realizó una prueba post-hoc (Tukey HSD) con probabilidad de error del 0,05%. Los datos obtenidos fueron organizados y tabulados en una base de datos utilizando software estadísticos SPSS versión 24.0.

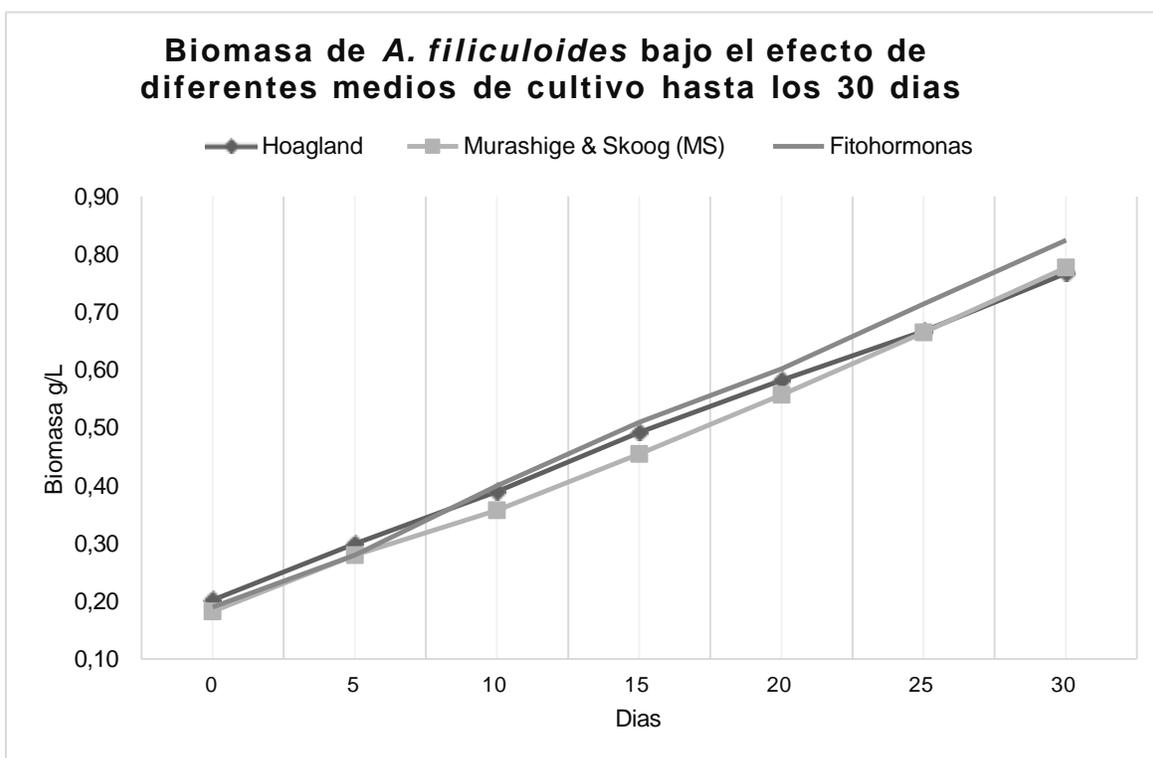
CAPÍTULO IV: Análisis e interpretación de resultados

4.1 Análisis e interpretación de los resultados

4.1.1. Determinación de biomasa fresca de *Azolla filiculoides* a los 30 días bajo la influencia de los diferentes tratamientos como medios de cultivo.

La figura 2 muestra el crecimiento de la biomasa de *Azolla filiculoides* bajo tres diferentes medios de cultivo (Hoagland, Murashige & Skoog (MS), y Fitohormonas) durante un período de 30 días. El eje x representa el tiempo en días que fueron evaluados los tratamientos, mientras que el eje y muestra la biomasa en gramos por litro (g/L).

Figura 2. Crecimiento de biomasa de *A. filiculoides* como respuesta al tratamiento de tres diferentes medios de cultivo durante un periodo de 30 días.



Todos los medios de cultivo muestran un aumento constante en la biomasa a lo largo del tiempo. Esto indica que todos los medios son efectivos para estimular el crecimiento de *A. filiculoides*.

Al realizar la comparación entre medios de cultivo se puede apreciar que el tratamiento con Fitohormonas parece ser el más efectivo, ya que tiene el valor más alto de biomasa al final de los 30 días, alcanzando alrededor de 0.83 g/L. El tratamiento con Murashige & Skoog (MS) muestra un rendimiento intermedio de 0.78 g/L. Finalmente, el tratamiento con Hoagland, con valores ligeramente menores, aunque también promueve el crecimiento, es el tratamiento menos efectivo en comparación con los otros dos, con un valor de biomasa que no supera los 0.77 g/L al final del experimento.

Este hallazgo es consistente con estudios previos que demuestran el papel crucial de las fitohormonas en la regulación del crecimiento vegetal, especialmente en procesos como la división celular y el alargamiento de tejidos (Koffler et al., 2014).

La tabla 4 describe el análisis de varianza (ANOVA) para las medias de la biomasa fresca de *A. filiculoides* obtenidas como efecto de los tratamientos y replicas efectuados.

Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA)

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	Valor F	Significa (p)
Tratamiento	0.206438	2	0.103219	2.078434	0.130627
Residual	5.960256	69			
Error experimental			0.087		
Total	6.166694	71			

El valor **p** obtenido en el análisis ANOVA fue **0.13**, lo que indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en términos de biomasa obtenida, ya que el valor es mayor a **0.05**. Sin embargo, el hecho de que el valor **F** sea mayor a 1 (**2.07**) sugiere que podría haber algunas tendencias que,

con un mayor tamaño de muestra o más replicaciones, los resultados podrían variar, como lo mencionan estudios que destacan la importancia del tamaño de muestra en la detección de efectos sutiles (Gelman & Carlin, 2014). Este resultado subraya la necesidad de optimizar el diseño experimental para obtener conclusiones más definitivas, ya que pequeñas diferencias en el crecimiento de biomasa podrían tener implicaciones importantes en la producción agrícola o en el uso de *Azolla filiculoides*.

La comparación de medias para los tratamientos sobre la biomasa fresca de *A. filiculoides* obtenidas se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Tukey HSD

Grupo 1	Grupo 2	Diferencia de medias	p-ajustada	Límite inferior	Límite superior	Rechazo
Fitohormonas	Hoagland	0.063571	0.6497	-0.104	0.2311	False
Fitohormonas	MS	0.055714	0.7099	-0.111	0.2235	False
Hoagland	MS	-0.007857	0.9	-0.175	0.1595	False

El análisis de Tukey HSD también confirma que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, dado que todas las comparaciones tienen valores p-ajustados mayores a 0.05. El tratamiento de Fitohormonas mostró un leve aumento en la biomasa en comparación con Hoagland y Murashige & Skoog, con una diferencia media de 0.063571 entre Fitohormonas y Hoagland.

Aunque no es estadísticamente significativo, este aumento podría ser relevante en estudios futuros si se implementan más repeticiones o se optimizan las condiciones de cultivo. De acuerdo con Bender & Lange, (2001), incluso cuando las comparaciones no son estadísticamente significativas, las tendencias observadas pueden ser indicativas de efectos biológicos importantes que podrían manifestarse

de manera más clara en experimentos futuros con mayor poder estadístico. Esto implica que, aunque los resultados actuales no muestren diferencias significativas, el uso de Fitohormonas sigue siendo prometedor y merece una investigación más profunda para determinar su potencial completo en la producción de biomasa.

4.1.2. Análisis Fitoquímico de la *Azolla filiculoides*

Los resultados del análisis fitoquímico de los compuestos bioactivos presente en la *Azolla filiculoides* se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de los compuestos bioactivos

Tratamiento	Fenoles Totales (mg/g)	Flavonoides (mg/g)	Alcaloides (mg/g)	Saponinas (mg/g)	Taninos (mg/g)
Hoagland	15.4	12.2	3.4	5.1	8.3
MS	13.2	14.7	2.9	4.8	7.5
Fitohormonas	17.6	16.1	4.1	6.3	9.1

Resultados obtenidos de la interpolación de Absorbancia

Según la tabla describe que el tratamiento con Fitohormonas parece ser el más prometedor en términos de producción de compuestos bioactivos:

- Fenoles Totales: 17.6 mg/g (más alto que los otros dos tratamientos).
- Flavonoides: 16.1 mg/g, indicando una alta capacidad antioxidante.
- Alcaloides y Saponinas: también son mayores en este tratamiento, lo que podría indicar un mayor valor bioactivo en aplicaciones médicas o agrícolas.

Este hallazgo coincide con lo que se ha reportado en la literatura científica. Según un estudio de Maswada et al., (2021), se ha demostrado que el uso de fitohormonas en cultivos de *Azolla* mejora significativamente la concentración de compuestos

bioactivos, lo que podría tener implicaciones importantes para la salud humana y el desarrollo de productos naturales.

CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

Aunque los tres medios de cultivo son adecuados para el crecimiento de *A. filiculoides*, el medio con fitohormonas parece ser el más efectivo, seguido de Hoagland, con Murashige & Skoog (MS) como el menos eficiente. Estos resultados sugieren que el uso de fitohormonas podría ser la mejor opción para maximizar la producción de biomasa en esta planta, especialmente si el objetivo es lograr altos niveles de crecimiento en períodos largos.

El tratamiento con Fitohormonas ha demostrado ser el más promisorio para la producción de compuestos bioactivos en *Azolla filiculoides*. Presenta los niveles más altos de fenoles totales (17.6 mg/g), lo que sugiere una mayor capacidad antioxidante. Asimismo, el contenido de flavonoides (16.1 mg/g) refuerza esta capacidad antioxidante, clave para aplicaciones en salud. Además, la mayor concentración de alcaloides y saponinas sugiere un potencial bioactivo superior, lo que podría traducirse en aplicaciones ventajosas tanto en el ámbito médico como agrícola.

5.2 Recomendaciones

Dado que los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$), se recomienda aumentar el número de réplicas o el tamaño de muestra para obtener resultados más robustos y detectar posibles diferencias en la producción de biomasa entre los tratamientos.

El tratamiento con fitohormonas mostró una tendencia a ser más efectivo tanto en la producción de biomasa como de compuestos bioactivos. Se sugiere optimizar aún más las condiciones de cultivo con este tratamiento, lo que podría mejorar su rendimiento y potencial bioactivo en aplicaciones agrícolas y médicas.

Dado el alto contenido de fenoles, flavonoides, alcaloides y saponinas en las plantas tratadas con fitohormonas, se recomienda investigar más a fondo sus aplicaciones potenciales, particularmente en los campos de la medicina y la agricultura, donde estos compuestos bioactivos podrían tener un impacto significativo.

Bibliografía

- Abd El-Aal, A. A. M. (2022). Anabaena-azollae, significance and agriculture application: A case study for symbiotic cyanobacterium. *Microbial Syntrophy-Mediated Eco-Enterprising*, 1–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99900-7.00006-7>
- Ahamed, A., & Vermette, P. (2008). Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 40(3), 399–407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.11.030>
- Alanoca Quispe, B. G. (2023). *Biorreactores para la producción de compuestos bioactivos polifenólicos a partir de tejidos vegetales: una revisión sistemática* [Universidad Católica de Santa María]. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/13109>
- Armijos, M. M. (2005). Estudio de la aplicación de Azolla Anabaena como bioabono en el cultivo de arroz en el Litoral ecuatoriano. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 18(1). <https://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/240>
- Ashok, A., Doriya, K., Rao, D. R. M., & Kumar, D. S. (2017). Design of solid state bioreactor for industrial applications: an overview to conventional bioreactors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 11–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.10.014>
- Bender, R., & Lange, S. (2001). Adjusting for multiple testing—when and how? *Journal of Clinical Epidemiology*, 54(4), 343–349. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(00\)00314-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0895-4356(00)00314-0)
- Carabalí Isajar, M. L. (2014). *Afloramiento de Azolla sp. presente en el humedal Carabalo (Valle del Cauca) Colombia: metabolitos secundarios y evaluación preliminar de toxicidad* [Universidad Nacional de Colombia]. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/54621>
- Cárdenas-Ortiz, R., López-Águila, M., & Roche-Delgado, L. (2022). Metodología

- para estimar el potencial fotosintético de algas en biorreactores. *Centro Azúcar*, 49(1), 62–70. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2223-48612022000100062&script=sci_arttext&lng=pt
- Castro, R., Novo, R., & Castro, R. I. (2002). Uso del género *Azolla* como biofertilizante en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 23(4), 5–10. <https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218135001>
- Castro, R., Novo, R., & Castro, R. I. (2003). Influence of *Azolla-anabaena* symbiosis on rice (*Oryza sativa* L) crop as a nutritional alternative. *Cultivos Tropicales*, 24(3), 77–82. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193218163012>
- Enríquez, M., Serrano, G., Dennis, C., & Paul, R. (2024). Efecto de los aceites esenciales de plantas aromáticas en la conservación de embutidos. *Revista de La Sociedad Científica Del Paraguay*, 29(1), 196–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.32480/rscp.2024.29.1.196>
- Espinoza, Y., & Gutierrez, R. (2006). Caracterización agronómica de accesiones de *Azolla* de Venezuela. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 23(2), 135–150. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0378-78182006000200001&script=sci_arttext
- Freire, E., Koch, A., & Salvador, L. (2016). Evaluación del potencial biofertilizante de consorcios de cianobacterias en pasto raygrass (*Lolium multiflorum*). *ECUADOR ES CALIDAD*, 4(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.36331/revista.v4i1.27>
- Gámez-Villazana, J. (2020). Avances en la determinación de compuestos bioactivos en alimentos. *Revista Agrollania de Ciencia y Tecnología*, 19. https://www.researchgate.net/profile/Jordy-Gamez-Villazana/publication/358738872_AVANCES_EN_LA_DETERMINACION_DE_COMPUESTOS_BIOACTIVOS_EN_ALIMENTOS/links/62129fd66c472329dcf8d926/AVANCES-EN-LA-DETERMINACION-DE-COMPUESTOS-BIOACTIVOS-EN-ALIMENTOS.pdf
- Garcinuño, Á. G., & Álvarez, J. M. S. (2023). *Biorreactores y tecnología de*

bioprocesos: libro de problemas resueltos. Aula Magna.

<https://produccioncientifica.usal.es/documentos/63dc628636479d3e033d1d7b?lang=gl>

Gelman, A., & Carlin, J. (2014). Beyond power calculations: Assessing type S (sign) and type M (magnitude) errors. *Perspectives on Psychological Science*, 9(6), 641–651. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1745691614551642>

González-Salazar, A. G., & Barahona-Amores, L. A. (2023). Azolla sp. como sustituto de fertilizantes nitrogenados en el cultivo de arroz de subsistencia Azolla sp. as a substitute for nitrogen fertilizers in the rice crop of subsistence. *Investigacion*, 11(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.37387/ipc.v11i1.329>

Gualinga, R. D. D., Barreto, J. L. R., Almeida, N. N. R., & Aguilera, D. S. (2024). Actividad antimicrobiana, antifúngica y tamizaje fitoquímico de *Simira cordifolia*. *Código Científico Revista de Investigación*, 5(1), 260–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.55813/gaea/ccri/v5/n1/382>

Hernández-Melchor, D. J., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2019). Trichoderma: importancia agrícola, biotecnológica, y sistemas de fermentación para producir biomasa y enzimas de interés industrial. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 35(1), 98–112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902019005000205>

Khodadad Hosseini, E., Derakhshi, P., Rabbani, M., & Mooraki, N. (2021). Pollutant removal from dairy wastewater using live *Azolla filiculoides* in batch and continuous bioreactors. *Water Environment Research*, 93(10), 2122–2134. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/wer.1586>

Koffler, B. E., Luschin-Ebengreuth, N., Stabentheiner, E., Müller, M., & Zechmann, B. (2014). Compartment specific response of antioxidants to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 227, 133–144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.08.002>

Korsa, G., Alemu, D., & Ayele, A. (2024). Azolla plant production and their potential applications. *International Journal of Agronomy*, 2024(1), 1716440.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2024/1716440>

Mancilla Castro, D. A., & Pérez Román, D. (2022). Rendimiento y valor nutricional de Azolla filiculoides fertilizada con estiércol de cuy en Arbieto, Cochabamba. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 9(2), 7–14. <https://doi.org/https://doi.org/10.53287/cbtn6542xa93u>

Maswada, H. F., Abd El-Razek, U. A., El-Sheshtawy, A.-N. A., & Mazrou, Y. S. A. (2021). Effect of Azolla filiculoides on growth, physiological and yield attributes of maize grown under water and nitrogen deficiencies. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(2), 558–573. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00344-020-10120-5>

Méndez-Martínez, Y., Pérez-Tamames, Y., Pérez, J. J. R., & Jimenez, V. D. P. (2018). Azolla sp., un alimento de alto valor nutricional para la acuicultura. *Biotechnia*, 20(1), 32–40. <https://www.redalyc.org/pdf/6729/672971085006.pdf>

Moreno–Romero, W., Velásquez, I., & Salinas, N. (2022). Uso de aceites comestibles como solventes para la extracción de compuestos bioactivos: Una revisión (parte A) Use of edible oils as solvents for the extraction of bioactive compounds: A review (part A). *Revista Ciencia e Ingeniería. Vol*, 43(1). https://www.researchgate.net/profile/Ingrid-Velasquez-2/publication/356603832_Uso_de_aceites_comestibles_como_solventes_para_la_extraccion_de_compuestos_bioactivos_Una_revision_parte_A_Use_of_edible_oils_as_solvents_for_the_extraction_of_bioactive_compoun

Nasir, N. A. N. M., Zakarya, I. A., Kamaruddin, S. A., & Islam, A. K. M. A. (2022). Advances and future prospects on biotechnological approaches towards Azolla for environmental sustainability. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 45(3), 595–609. <https://doi.org/https://doi.org/10.47836/pjtas.45.3.04>

Pabón, L. C., & Hernández-Rodríguez, P. (2012). Importancia química de Jatropha curcas y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), 194–209.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962012000200008&script=sci_arttext&tlng=en

- Pardo, F. T., Aparco, R. H., Quispe, I. M., Pacheco, N. F. F., Cerna, H. W. A., & Chipana, S. Q. (2023). Compuestos bioactivos y actividad antioxidante de aceites esenciales en hojas de plantas medicinales. *Alfa Revista de Investigación En Ciencias Agronómicas y Veterinaria*, 7(21), 547–559. <https://doi.org/https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v7i21.235>
- Pérez Hernández, Y., Amaro Sánchez, D., Robledo Ortega, L., Martínez Mora, M. M., & Rondón Castillo, A. J. (2021). Caracterización fitoquímica y antibacteriana de cinco plantas arvenses presentes en la provincia de Matanzas, Cuba. *Centro Agrícola*, 48(3), 32–42. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-57852021000300032&script=sci_arttext
- Peters, G. A., & Mayne, B. C. (1974). The Azolla, Anabaena azollae relationship: I. Initial characterization of the association. *Plant Physiology*, 53(6), 813–819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1104/pp.53.6.813>
- Quezada, M. del P. R., Gamarra, O., & Azahuanche, F. R. P. (2021). Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de seis plantas medicinales usadas en Amazonas. *Medicina Naturista*, 15(1), 32–37. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7747848>
- Radillo, J. J. V., López, M. A. R., Fuentes, B. C. V., Elías, M. A. B., & Ramírez, L. B. (2023). OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE PLANTAS MEDICINALES. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 54, 122–134. <http://scielo.sld.cu/pdf/rccq/v54/2221-2442-rccq-54-122.pdf>
- Ramírez, I., Ramfrez-Villarreal, A., & Ospina-Nieto, J. (2020). Modelado y control no lineal de ácidos grasos volátiles en un biorreactor anaerobio de lecho fijo y flujo ascendente (UAFBR). *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 19(36), 53–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.22395/rium.v19n36a3>
- Rodríguez, J. H. V., Barzallo, D., Aveiga, M. del R. V., & Barcia-Anchundia, J. X.

- (2024). Efecto bioestimulante de los microorganismos sobre la germinación in vitro de semillas híbridas de pimiento. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 25(1). https://doi.org/https://doi.org/10.21930/rcta.vol25_num1_art:3306
- Schoch CL., et al. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford), PubMed*: 32(PMC: PMC7408187).
- Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>
- Torres-Aguirre, G. A., Muñoz-Bernal, Ó. A., Álvarez-Parrilla, E., Núñez-Gastélum, J. A., Wall-Medrano, A., Sáyago-Ayerdi, S. G., & Rosa, L. A. (2018). Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.2.4>
- Torres Usechi, J. I. (2014). *Diseño de prototipo de un biorreactor de lecho fijo y tambor giratorio alimentado por energía fotovoltaica, para la producción de compost, a partir de azolla feliculoides y typha latifolia, de la laguna chocolate de una Cundinamarca*. [Universidad Libre]. <http://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/8456>
- Trejo-Márquez, M. A., Vargas-Martínez, M. G., Sánchez-Soto, A., Vargas, A. A. L., Pascual-Bustamante, S., López, G. G., & González, A. G. V. (2015). Extracción de compuestos bioactivos de plantas del desierto mexicano para su aplicación en envases activos para zarzamora. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 101–107. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81339864015>
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los fluidos

supercríticos en la agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1), 53–66.

<https://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n1/art09.pdf>

Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Veana, F., & Muñiz-Márquez, D. B. (2020).

Impacto de las tecnologías de extracción verdes para la obtención de compuestos bioactivos de los residuos de frutos cítricos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23(1), 1–11.

<https://doi.org/https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.255>

Anexos

Biomasa y tasa de crecimiento relativa por cada replica respecto al tratamiento 1: Solución de Hoagland

Réplica R1

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.16	60.0
10	0.24	140.0
15	0.36	260.0
20	0.52	420.0
25	0.72	620.0
30	0.98	880.0

Réplica R3

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.14	40.0
10	0.21	110.0
15	0.32	220.0
20	0.47	370.0
25	0.67	570.0
30	0.92	820.0

Réplica R2

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.15	50.0
10	0.23	130.0
15	0.35	250.0
20	0.50	400.0
25	0.70	600.0
30	0.95	850.0

Réplica R4

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.15	50.0
10	0.22	120.0
15	0.34	240.0
20	0.49	390.0
25	0.69	590.0
30	0.94	840.0

Biomasa y tasa de crecimiento relativa por cada replica respecto al tratamiento 2: Murashige & Skoog (MS)

Réplica R1

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.13	30.0
10	0.18	80.0
15	0.25	150.0
20	0.34	240.0
25	0.45	350.0
30	0.58	480.0

Réplica R3

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.11	10.0
10	0.16	60.0
15	0.22	120.0
20	0.29	190.0
25	0.39	290.0
30	0.50	400.0

Réplica R2

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.12	20.0
10	0.17	70.0
15	0.23	130.0
20	0.31	210.0
25	0.41	310.0
30	0.53	430.0

Réplica R4

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.12	20.0
10	0.17	70.0
15	0.24	140.0
20	0.32	220.0
25	0.42	320.0
30	0.54	440.0

Biomasa y tasa de crecimiento relativa por cada replica respecto al tratamiento 3: Fitohormonas

Réplica R1

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.17	70.0
10	0.29	190.0
15	0.45	350.0
20	0.65	550.0
25	0.90	800.0
30	1.20	1100.0

Réplica R2

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.18	80.0
10	0.31	210.0
15	0.48	380.0
20	0.70	600.0
25	0.95	850.0
30	1.25	1150.0

Réplica R3

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.16	60.0
10	0.28	180.0
15	0.43	330.0
20	0.62	520.0
25	0.86	760.0
30	1.15	1050.0

Réplica R4

Día	Biomasa (g/L)	RGR (%)
0	0.10	0.0
5	0.17	70.0
10	0.30	200.0
15	0.47	370.0
20	0.68	580.0
25	0.93	830.0
30	1.23	1130.0

Valores de Absorbancia

Tratamiento	R	C.I N (mg/L)	Abs I	C.F N (mg/L)	Abs Final	N. (mg/L)	C	Día
Hoagland	R1	62.809	1.132	61.809	0.562	1.0		30
Hoagland	R2	62.809	1.505	61.809	0.958	1.0		30
Hoagland	R3	62.809	1.044	61.809	0.645	1.0		30
Hoagland	R4	62.809	1.919	61.809	1.358	1.0		30
MS	R1	75.427	1.269	74.427	1.125	1.0		30
MS	R2	75.427	1.673	74.427	1.475	1.0		30
MS	R3	75.427	1.322	74.427	1.199	1.0		30
MS	R4	75.427	1.53	74.427	1.267	1.0		30
Fitohormonas	R1	81.409	1.557	80.409	1.262	1.0		30
Fitohormonas	R2	81.409	1.195	80.409	0.959	1.0		30
Fitohormonas	R3	81.409	1.98	80.409	1.465	1.0		30
Fitohormonas	R4	81.409	1.785	80.409	1.507	1.0		30

Nota.- La tabla indica el consumo de nitrógeno en base a la concentración inicial y concentración final

Consolidado de los valores obtenidos respecto a biomasa

Day	Treatment	RGR	AGR	TD	ECB
0	Hoagland	0.0	sin-inf	sin-inf	0.21
5	Hoagland	51.21	0.02	1.35	0.31
10	Hoagland	109.4	0.02	0.63	0.42
15	Hoagland	174.63	0.03	0.4	0.55
20	Hoagland	223.98	0.02	0.31	0.65
25	Hoagland	276.53	0.02	0.25	0.74
30	Hoagland	319.04	0.03	0.22	0.87
0	Hoagland	0.0	sin-inf	sin-inf	0.22
5	Hoagland	66.02	0.02	1.05	0.31
10	Hoagland	138.22	0.02	0.5	0.42
15	Hoagland	194.2	0.02	0.36	0.51
20	Hoagland	262.39	0.02	0.26	0.6
25	Hoagland	323.29	0.02	0.21	0.7
30	Hoagland	372.76	0.01	0.19	0.76
0	Hoagland	0.0	sin-inf	sin-inf	0.17
5	Hoagland	63.1	0.02	1.1	0.25
10	Hoagland	111.01	0.02	0.62	0.33
15	Hoagland	174.37	0.02	0.4	0.44
20	Hoagland	197.34	0.02	0.35	0.52
25	Hoagland	253.53	0.01	0.27	0.59
30	Hoagland	302.62	0.03	0.23	0.72
0	Hoagland	0.0	sin-inf	sin-inf	0.2
5	Hoagland	52.49	0.02	1.32	0.3
10	Hoagland	83.54	0.01	0.83	0.37
15	Hoagland	132.82	0.02	0.52	0.46
20	Hoagland	188.04	0.02	0.37	0.56
25	Hoagland	254.81	0.02	0.27	0.64
30	Hoagland	301.01	0.02	0.23	0.74
0	MS	0.0	sin-inf	sin-inf	0.19
5	MS	46.32	0.02	1.5	0.28
10	MS	100.12	0.02	0.69	0.37

15	MS	162.26	0.03	0.43	0.51
20	MS	207.67	0.02	0.33	0.61
25	MS	253.07	0.02	0.27	0.69
30	MS	315.75	0.02	0.22	0.8
0	MS	0.0	sin-inf	sin-inf	0.18
5	MS	42.08	0.02	1.65	0.28
10	MS	93.55	0.01	0.74	0.34
15	MS	135.68	0.01	0.51	0.41
20	MS	177.79	0.02	0.39	0.52
25	MS	226.48	0.02	0.31	0.63
30	MS	255.15	0.02	0.27	0.74
0	MS	0.0	sin-inf	sin-inf	0.2
5	MS	53.63	0.02	1.29	0.29
10	MS	101.81	0.01	0.68	0.36
15	MS	166.03	0.02	0.42	0.45
20	MS	215.48	0.02	0.32	0.54
25	MS	258.83	0.02	0.27	0.66
30	MS	336.97	0.02	0.21	0.77
0	MS	0.0	sin-inf	sin-inf	0.16
5	MS	51.85	0.02	1.34	0.27
10	MS	88.42	0.02	0.78	0.36
15	MS	134.01	0.02	0.52	0.45
20	MS	186.3	0.02	0.37	0.56
25	MS	225.68	0.02	0.31	0.68
30	MS	280.68	0.02	0.25	0.8
0	Fitohormonas	0.0	sin-inf	sin-inf	0.18
5	Fitohormonas	50.09	0.02	1.38	0.28
10	Fitohormonas	96.89	0.02	0.72	0.38
15	Fitohormonas	169.79	0.02	0.41	0.5
20	Fitohormonas	222.84	0.02	0.31	0.59

25	Fitohormonas	264.78	0.02	0.26	0.69
30	Fitohormonas	326.73	0.02	0.21	0.77
0	Fitohormonas	0.0	sin-inf	sin-inf	0.18
5	Fitohormonas	59.33	0.02	1.17	0.29
10	Fitohormonas	93.96	0.03	0.74	0.42
15	Fitohormonas	135.79	0.02	0.51	0.52
20	Fitohormonas	194.98	0.02	0.36	0.64
25	Fitohormonas	260.35	0.02	0.27	0.75
30	Fitohormonas	319.25	0.02	0.22	0.83
0	Fitohormonas	0.0	sin-inf	sin-inf	0.21
5	Fitohormonas	47.54	0.03	1.46	0.34
10	Fitohormonas	83.17	0.02	0.83	0.44
15	Fitohormonas	126.47	0.03	0.55	0.57
20	Fitohormonas	172.39	0.01	0.4	0.62
25	Fitohormonas	233.67	0.02	0.3	0.73
30	Fitohormonas	287.73	0.02	0.24	0.83
0	Fitohormonas	0.0	sin-inf	sin-inf	0.19
5	Fitohormonas	64.64	0.02	1.07	0.3
10	Fitohormonas	120.66	0.01	0.57	0.36
15	Fitohormonas	173.15	0.02	0.4	0.45
20	Fitohormonas	241.28	0.02	0.29	0.56
25	Fitohormonas	314.49	0.03	0.22	0.69
30	Fitohormonas	386.5	0.02	0.18	0.78

Nota. - En la tabla se observan los valores de los tres tratamientos las cuatro repeticiones en relación a los 7 momentos de toma de muestra

Producción de *Azolla* en reactores y medición de variables



UNEMI

UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

¡Evolución académica!

@UNEMIEcuador

