

6 INFLUENCIA DEL TIEMPO Y LA CONCENTRACIÓN DEL SOLVENTE EN LA PRODUCCIÓN DE EXTRACTO DE AZOLLA SPP.

INFLUENCE OF TIME AND SOLVENT CONCENTRATION ON THE PRODUCTION OF AZOLLA SPP. EXTRACT.

Kimberly Natacha Colorado Rodríguez¹, Diana Elizabeth Aguilar Arias¹, Julio Amílcar Pineda-Insuasti², Camilo Alejandro Pineda-Soto³, Ivette Graciela Mora Lovato².

¹Instituto Superior Tecnológico 17 de Julio, Urcuquí, Ecuador

²Centro Ecuatoriano de Biotecnología y Ambiente, Ibarra, Ecuador

³BIOECOLÓGICOS. www.bioecologicos.com, Ibarra, Ecuador

Autor para correspondencia: coloradokimberly766@gmail.com

Recibido: 07/10/22

Aceptado: 08/11/22

RESUMEN

Existe limitado conocimiento en el campo del extracto de Azolla, por lo cual se propone realizar esta investigación con el fin de optimizar el proceso de extracción de Azolla spp. Esto mediante una extracción hidroalcohólica a diferentes concentraciones y diferentes tiempos de maceración que permitan determinar los factores y variables clave para una mayor cantidad de SDT en el extracto. Se determina el modelo matemático que permite optimizar el proceso con las variables de tiempo de maceración y concentración de la disolución.

PALABRAS CLAVE: Proteína, Sólido-Líquido, modelo matemático.

INTRODUCCIÓN

La Azolla es un helecho acuático, flotante de la familia Azollaceae y el orden Pteridophyta (Bacerra et al., 1995; Wagner, 1997). El nombre hace referencia a la conjunción de dialectos azo y allyo, que significan secar y matar respectivamente, esto debido a que el helecho se puede morir si fuese expuesto a condiciones de sequía.

De acuerdo con Mathur et al. (2013), se conocen al menos ocho especies de *Azolla en el mundo, a saber, Azolla pinnata, Azolla*

ABSTRACT

There is limited knowledge in the field of Azolla extract, which is why it is proposed to carry out this research in order to optimize the extraction process of Azolla spp. This through a hydroalcoholic extraction at different concentrations and different maceration times that allow determining the key factors and variables for a greater amount of SDT in the extract. The mathematical model that allows optimizing the process with the variables of maceration time and concentration of the solution is determined.

KEYWORDS: Protein, Solid-Liquid, mathematical model.

nilotica, Azolla caroliniana, Azolla japonica, Azolla circinata, Azolla microphylla, Azolla rubra y Azolla mexicana, de las cuales, la más común es Azolla pinnata.

Por su parte, Pillai et al. (2005) afirman que la Azolla es una fuente de carbono y nutrientes, además de proveer una cavidad que protege a las colonias de Anabaena a cambio de dinitrógeno atmosférico y promotores de crecimiento; esta relación de simbiosis hace que la Azolla sea una planta rica en proteínas (Moventhan et al., 2019).

Por lo tanto, la Azolla se considera una fuente primordial de nutrientes. Además, el cianobionte de *Anabaena azollae* contiene, ficobiliproteínas y carotenoides (Tyagi et al., 1980). Cabe recalcar que, sus contenidos de carbohidratos y aceite no son altos, a diferencia de su gran capacidad de ser digerible debido a su alto contenido de lignina y proteína (Anitha et al., 2016).

De acuerdo con Namra et al. (2010), quienes revelaron la presencia de altos niveles de energía en la Azolla, lo cual es importante tanto para la disponibilidad de los nutrientes como para la digestión. De acuerdo con Kannaiyan (1992), la Azolla parece ser un posible biofertilizante debido a la contribución de nitrógeno a los cultivos de arroz.

De acuerdo con los usos conocidos de la azolla se plantea principalmente como abono, aunque recientemente se ha usado como repelente de mosquitos, herbicida, purificador de agua, ahorrador de fertilizantes (van Hove & Lejeune, 1996), medicamento para la tos (Raja et al., 2012), productor de biogás (Das et al., 1994; van Hove, 1989), biorremediador (Sood et al., 2012; Yadav et al., 2014) y recuperador de suelos afectados por salinidad (Raja et al., 2012).

Además, la literatura reporta que la adición de Azolla en las raciones de alimento reduce significativamente su costo (Bacerra et al., 1995; Escobin, 1987; Lawas et al., 1998; Sujatha et al., 2013).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se investigó a escala de laboratorio la producción de un extracto a partir de *Azolla* spp. El trabajo experimental se realizó en el laboratorio del Centro Ecuatoriano de Biotecnología del Ambiente (CEBA), localizada en la ciudad de Ibarra, Ecuador a 2200 metros sobre el nivel del mar y con una temperatura promedio de 18 °C.

Material genético

Como material genético se utilizó la *Azolla* spp. de producción nacional cultivada de forma artesanal en la finca del señor Franco Agustín Ordóñez Godoy, ubicada en la parroquia del Quinche, cantón Quito, Provincia de Pichincha.



Figura 1. Cosecha de Azolla

Diseño experimental y análisis estadístico

Se ha creado un diseño factorial multinivel que consiste en 12 corridas. El diseño deberá ser ejecutado en 3 bloques. El orden de los experimentos ha sido completamente aleatorizado. Esto aportará protección contra el efecto de variables ocultas.

Diseño Base

Número de factores experimentales: 2

Número de bloques: 3

Número de respuestas: 1

Número de corridas: 12

Grados de libertad para el error: 6

Aleatorizar: Sí

Tabla 1. Factores clave del diseño experimental

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
Tiempo	12,0	24,0	2	(h)
Concentración	12,0	25,0	2	(%)

Tabla 2. Variable dependiente y unidad de medida

Respuestas	Unidades
SDT	(ppt)

Se estableció como unidad experimental una muestra de 10 g de Azolla seca y molida. Como factores de estudio se definieron el tiempo de agitación y la concentración del solvente. Se

establecieron como parámetros de operación el tamaño de partícula de 0,5 mm, pH de 7,2, la velocidad de agitación de 100 rpm y presión atmosférica (101,3 KPa). La variable de respuesta seleccionada fue la productividad del proceso de extracción por maceración dinámica, medida como los ppt de Sólidos Disueltos Totales (SDT). Como factores de ruido se verifica la cantidad de luz y la temperatura ambiente. Se utilizó el software estadístico STATGRAPHICS, para crear un diseño experimental factorial estándar 2², con tres replicas, completamente aleatorio, con un total de 12 tratamientos.

Procedimiento

La muestra de Azolla fue secada en un horno, a 60 °C, hasta peso constante, luego se pulverizó en una licuadora industrial de marca MONTERO-LAR-15PMB. La muestra de materia prima se tamizó en tamaño de 0,5 mm. Como solvente se utilizó una solución de agua con alcohol etílico neutro rectificado, en concentración de 12 y 25 %. Se llenaron las jarras de vidrio de 250 ml con 10 g de muestra de Azolla y 100 ml de solución hidroalcohólica y posteriormente se procedió a realizar la maceración dinámica, en un equipo agitador de marca BIODIVERSITY. Luego de la maceración dinámica, las muestras se filtraron través de un papel de filtro de celulosa gruesa de 0,3 micras con la ayuda de una bomba de vacío marca QUALITY QVP-500, cada muestra filtrada se le midió los SDT con un equipo marca HANNA.



Figura 2. Proceso de selección de muestras de Azolla.



Figura 3. Proceso de secado.



Figura 4. Proceso de pulverización.



Figura 5. Maceración de las muestras.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se presenta la Azolla utilizada en el experimento. En relación con su composición se determinó que la azolla es una fuente que posee un alto contenido de proteínas (25-35 %), nitrógeno (Lumpkin, 1984), gran variedad de aminoácidos esenciales (7-10 %), como lisina (Van Hove, 1989), además contiene minerales esenciales como hierro, calcio, fósforo, magnesio, manganeso, potasio, hierro y cobre (10-15%), también contiene diversas vitaminas como la vitamina A y la vitamina B12 (Lejeunea et al., 1999), carotenoides, clorofila, bio-polímeros y probióticos (Cherryl et al., 2014; Henry et al., 2017; Mathur et al., 2013; Parashuramulu et al., 2013).



Figura 6. Medición de SDT

En la Tabla 3, se presenta la matriz de resultados experimentales, como se puede apreciar se logra un mínimo de 1,4 ppt (SDT) cuando se trabaja con 12 horas de maceración y 25% de concentración del solvente. Por otro lado, se encontró un máximo 2,31 ppt (SDT) cuando se trabaja con 12 horas de maceración y 12% de concentración del solvente.

Tabla 3. Matriz de Resultados Experimentales

No Bloque	Tiempo (h)	Concentración (%)	SDT (ppt)	
1	1	12	25	1,52

2	1	24	25	1,52
3	1	12	12	2,22
4	1	24	12	2,26
5	2	12	25	1,48
6	2	12	12	2,31
7	2	24	12	2,18
8	2	24	25	1,52
9	3	12	25	1,4
10	3	24	12	2,28
11	3	24	25	1,48
12	3	12	12	2,31

Fuente: Elaborada por el autor

Análisis de Varianza para SDT

En la tabla 4 se presenta el ANOVA el cual particiona la variabilidad de SDT en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efecto tiene un valor-P menor que 0,05, indicando que es significativamente diferente de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

Tabla 4. Análisis De Varianza para SDT

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
A: Tiempo	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B: Concentración	1,79413	1	1,79413	560,18	0,0000
AB	0,0048	1	0,0048	1,50	0,2668
bloques	0,000316667	2	0,000158333	0,05	0,9521
Error total	0,0192167	6	0,00320278		
Total (corr.)	1,81847	11			

Fuente: Elaborada por el autor

La ecuación de regresión del modelo empírico ajustado a los datos de SDT es la siguiente:

$$SDT = 3,14462 - 0,00948718 * \text{Tiempo} - 0,0687179 * \text{Concentración} + 0,000512821 * \text{Tiempo} * \text{Concentración}$$

Optimización de la respuesta

Esta tabla 3 se muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual maximiza los valores de SDT sobre la región indicada.

Meta: maximizar SDT
 Valor óptimo = 2,28

Tabla 5. Optimización de la respuesta

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Tiempo	12,0	24,0	12,0
Concentración	12,0	25,0	12,0

Fuente: Elaborada por el autor

En la figura 7 se presenta el Diagrama de Pareto Estandarizada para SDT, como se puede observar, la es significativo, por lo cual dicho factor debe conservarse en el modelo matemático empírico.

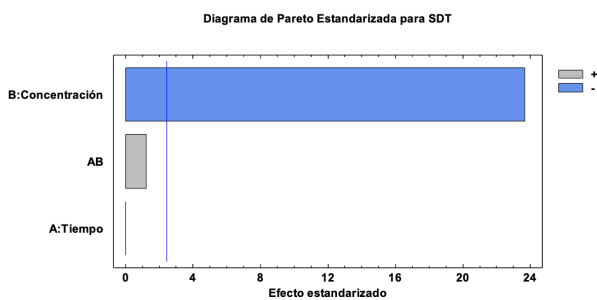


Figura 7. Diagrama de Pareto Estandarizada para SDT

En la figura 8 se presenta la Superficie de Respuesta Estimada para SDT, en la cual se puede observar que el punto máximo logrado de SDT se da con las condiciones de tiempo = 12 h y concentración = 12%.

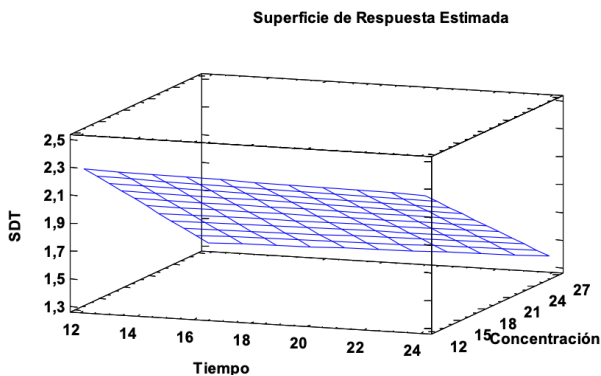


Figura 8. Superficie de Respuesta Estimada

CONCLUSIONES

La biocomposición de la Azolla la convierte en una alternativa de alimentación más económica, accesible, eficientes y mantenible para el ganado y las aves de corral. Por ejemplo, la harina de *Azolla pinnata* se ha utilizado exitosamente para la alimentación de patos, pollos de engorde y ponedoras, codornices, conejos y peces.

En esta investigación se destaca la capacidad de disolución de la Azolla en distintas concentraciones alcohólicas, en donde se puede concluir que la disolución más optima entorno a las condiciones de este experimento se brinda en base a una maceración de 12 horas y una concentración de 12% de alcohol. De esto se puede concluir que con un tiempo moderado de maceración se obtiene disolución con mayor cantidad de SDT, siempre y cuando se mantenga una concentración alcohólica baja.

AGRADECIMIENTO

Los autores expresan su agradecimiento al Centro Ecuatoriano de Biotecnología, Ambiente, y al Instituto Superior Tecnológico - 17 de Julio y al señor Franco Agustín Ordóñez Godoy por la cooperación en la realización de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anitha, Rajeshwari, Prasanna, & Shilpa. (2016). Nutritive evaluation of Azolla as livestock feed. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 670–674. [http://dx.doi.org/10.18006/2016.4\(Issue6\).670.674](http://dx.doi.org/10.18006/2016.4(Issue6).670.674)
2. Bacerra, Preston, & Ogle. (1995). Effect of replacing whole boiled soya beans with Azolla in the diets of growing ducks. *Livestock Research for Rural Development*, 7, 1–11. <http://www.lrrd.org/lrrd7/3/7.htm>
3. Das, Sikdar, & Chetterjee. (1994). Potential of Azolla pinnata as biogas generator and as a fish feed. *Indian Journal of Environmental Health*, 36, 186–191. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19961300822>
4. Escobin. (1987). *Fresh Azolla (Azollamicrophylla kaulfuss) as partial replacement to palay-snail-shrimp based ration for laying mallard and growth-fattening Muscovy ducks*. University Los Banos, College, Laguna.
5. Kannaiyan. (1992). *Azolla Biofertilizer Technology for Rice*. Tamil Nadu Agricultural University.
6. Lawas, Roxas, & Lambio. (1998). Laying performance of Philippine Mallard ducks fed diets substituted with fresh Azolla. *Recent Developments in Animal Production*, 220–225.
7. Mathur, Sharma, & Choudhary. (2013). Use of Azolla (Azolla pinnata) as cattle feed supplement. *Journal of Krishi Vigyan*, 2, 73–75. <http://iskv.in/wp-content/themes/iskv/volumepdfs/77c375b4c30658fe6bd13845afae0010jkv-2-1-018.pdf>
8. Mooventhan, Kumar, Dixit, Sharma, Sivalingam, Gupta, Singh, Singh, Venkatesan, & Kaushal. (2019). Azolla: The super plant for sustainable feed production. *Indian Farming*, 69, 26–27. https://www.nibsm.res.in/images/Azolla_The_super_plant_for_sustainable_feed_production.Indian_Farming.pdf
9. Namra, Hataba, & Abdel. (2010). The productive performance of growing Fayoumi chicks fed restricted diets supplemented with free fresh Azolla. *Egyptian Poultry Science Journal*, 30, 747–762. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774740/>
10. Pillai, Premalatha, & Rajamony. (2005). Azolla: A Sustainable Feed for Livestock. . *LEISA Magazine*, 21, 15–17. <http://www.gemenskapspraktik.se/projects/theazollacookingandcultivationproject/research/Azolla,%20a%20sustainable%20feed%20for%20livestock.pdf>
11. Raja, Rathaur, John, & Ramteke. (2012). Azolla: an aquatic Pteridophyte with great potential. . *International Journal of Research in Biological Sciences*, 2, 68–72. https://dofr.pw/feta_cy_cygub_n.pdf
12. Sood, Uniyal, Prasanna, & Ahluwalia. (2012). Phytoremediation potential of aquatic macrophyte. *Azolla*, 122–137. <https://doi.org/10.1007/s13280-011-0159-z>
13. Sujatha, Kundu, Jeyakumar, & Kundu. (2013). Azolla supplementation: Feed cost benefit in duck ration in Andaman Islands. *Tamil Nadu Journal of Veterinary Animal Science*, 9, 130–136.
14. Tyagi, Mayne, & Peters. (1980). Purification and initial characterization of phycobiliproteins from the endophytic cyanobacterium of Azolla. *Archives of Microbiology*, 128, 41–44. : <https://doi.org/10.1007/BF00422303>
15. van Hove. (1989). Azolla and its multiple use with emphasis on Africa. *Food and Agriculture Organization*, 21, 112–116. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XF19910069349>
16. van Hove, & Lejeune. (1996). Does Azolla have any future in agriculture? In Biological Nitrogen Fixation Associated with Rice Production (Ed.), *Does Azolla have any future in agriculture?* (pp. 83–94). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
17. Wagner. (1997). Azolla: A review of its biology and utilization. *The Botanical Review*, 63, 1–26. <https://www.jstor.org/stable/4354285>

18. Yadav, Abraham, Singh, & Singh. (2014). Advancements in the utilization of Azolla-Anabaena system in relation to sustainable agricultural practices. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, , 80, 301–316. http://www.insaindia.org/journals/proceedings/Vol80_2014_2_Art14.pdf