

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO DE ALGAS

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al campo técnico de la industria química y, en particular, se refiere a un método mejorado para la obtención de extracto de algas. En más particular se refiere a un método para la obtención de extracto de algas que comprende trocear el alga fresca, secarla y/o deshidratarla, mezclar con agua, y macerar a una elevada temperatura hasta obtener una fase sólida y una fase líquida, y seguidamente, estabilizar la fase líquida y filtrar para obtener finalmente el extracto de alga. La presente invención también se refiere al uso del producto obtenido por el método reivindicado como bioestimulante en cultivos de plantas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En la actualidad, existen unas sustancias que están cobrando gran importancia dentro de la industria agrícola que se denominan bioestimulantes agrícolas y que actúan sobre la fisiología de la planta de diferentes formas y por diferentes vías para mejorar el vigor del cultivo, el rendimiento y calidad de la cosecha. Dichos productos tienen variados orígenes, y debido a que, al aplicarse a las plantas, son capaces de mejorar la eficacia de éstas en la absorción y asimilación de nutrientes, tolerancia a estrés biótico o abiótico o mejorar alguna de sus características agronómicas, su uso cada vez es más extendido en una gran variedad de cultivos.

Uno de los principales orígenes de los bioestimulantes agrícolas son los extractos de algas. De hecho, en la actualidad existen varias empresas a nivel mundial que son productoras de extractos de algas en el sector agrícola la empresa Kelp Products International que produce un extracto de la especie de alga *Ecklonia maxima* y es titular de la patente N° ZA201300362 (B), la empresa Afrikelp que también produce diversos extractos de algas, para productos propios y para otras compañías del sector agrícola, y la empresa PLYMAG, titulares de la presente solicitud de patente.

Para poder preparar los bioestimulantes cuyo origen son las algas, las empresas del sector especializadas en este tipo de productos han desarrollado distintas técnicas para poder obtener su extracto.

En la patente referenciada anteriormente ZA201300362 (B), se describe un proceso de obtención del extracto de alga que se denomina "Técnica de la rotura celular en frío", proceso que consiste en cortar y lavar el alga, para posteriormente introducirlo en una cámara de presión donde se somete la materia prima a presión extremadamente elevada comprendida entre 400 y 600 bar y que solo se mantiene durante un corto periodo de tiempo. Seguidamente, dicha presión disminuye rápidamente a presión atmosférica, mediante el empleo de una válvula de escape. Este cambio brusco de presión es el que genera que las células se rompan. Finalmente, la fracción líquida es recuperada, mientras que el residuo en forma de pulpa se queda en el interior de la cámara. De esta forma se obtiene un extracto de alga sin emplear productos químicos, calor, congelación o deshidratación.

Por otro lado, la empresa Afrikelp también ha desarrollado su propio proceso de obtención de extracto de alga, el cual denomina Proceso de Micronización Frio, que se basa en micronizar y filtrar las algas frescas, sin emplear ningún tipo de producto químico ni hacer uso de elevadas temperaturas.

No obstante, tanto el proceso descrito por la patente ZA201300362 (B) como el descrito por la empresa Afrikelp presentan una gran limitación ya que su rendimiento en ambos procesos está condicionado por la cantidad de materia de la que se parte. En ambos procedimientos, es necesario partir de una elevada cantidad de materia prima para poder obtener una elevada cantidad de extracto, lo que implica un elevado coste tanto en materia prima como durante el proceso de obtención del extracto de alga.

Por este motivo, se ha visto la necesidad de desarrollar un nuevo procedimiento de extracción de alga, que permita aumentar el rendimiento del mismo obteniendo más extracto con la misma cantidad de alga, sin perder la actividad de dicho extracto.

Es por ello por lo que la presente invención tiene por objeto solventar de una manera económicamente viable y eficaz el problema de los elevados costes y dificultades tecnológicas de los métodos que se emplean actualmente en la industria mediante un nuevo procedimiento de obtención de extracto de alga completamente diferente a los anteriores, comenzando desde la materia prima, el alto rendimiento del proceso, es decir, obteniendo una mayor concentración de extracto de alga por unidad de volumen de

producto, el cual comprende además unas fitohormonas sorprendentemente eficaces.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un nuevo método para la obtención de un extracto
5 de algas caracterizado por que comprende:

- (a) Introducir masa de alga con una humedad comprendida entre 2 a 85% p/p en un reactor con agua en una cantidad proporcional Kg agua / Kg alga comprendido entre 0,5-15;
- (b) dejar macerar la mezcla obtenida en el paso anterior durante un periodo de tiempo
10 de 0,5 a 48 horas a temperatura de entre 40-98 °C y, seguidamente,
- (c) separar la fase sólida de la fase líquida cuando la fase líquida ha alcanzado el residuo seco deseado de entre 1,5 a 3,5 % p/p,
- (d) filtrar la fase líquida obtenida a través de un filtro de mangas con un tamaño de poro que sea igual o superior 80 µm.

15 En el paso (c) se obtiene residuo seco expresado en % p/p, que en el contexto de la presente invención, refleja la cantidad de producto que queda al eliminar toda el agua de la muestra. Sirva como ejemplo ilustrativo, en el caso de que en el paso (c) se obtenga un residuo seco del 3 % p/p indicaría que si tomamos 100 g de la muestra y eliminamos el
20 agua que ella contiene, se obtendrá 3 g de residuo seco, que en el caso de no haber añadido ningún componente externo, serán 3 g de extracto puro sólido de algas.

Cabe destacar que el método objeto de la invención se realiza a presión atmosférica. A este respecto se desea indicar que se conoce con el nombre de presión
25 atmosférica en un punto el "peso" de la columna de aire que se encuentra por encima de dicho punto hasta que se acaba la atmósfera. Este valor, como se puede comprender, es muy difícil de concretar debido a que la densidad del aire disminuye con la altura, afectando a la masa y, como consecuencia al peso, además de variar con las condiciones meteorológicas. De forma general, el valor de la presión atmosférica puede
30 variar en torno a 1 atm que corresponde con un 101325 Pa pudiendo oscilar en base exclusivamente de las condiciones atmosféricas tal y como se ha indicado con anterioridad.

En una realización preferida de la presente invención, la materia prima de la que se
35 parte para realizar el método objeto de la invención es masa de alga *Ecklonia maxima*

deshidratada con una humedad comprendida entre 2 a 30% p/p y en una realización más preferida, dicha masa puede tener una humedad comprendida entre 3 a 15% p/p. Además, en esta realización preferida, teniendo en cuenta la humedad relativa del material de partida, la cantidad proporcional de Kg agua / Kg alga que se introduce en el reactor de la etapa (a) está comprendido entre 7-15.

En otra realización preferida de la presente invención, la materia prima de la que se parte para realizar el método objeto de la invención es masa de alga *Ecklonia maxima* con una humedad comprendida entre 70 a 85% p/p y en una realización más preferida, dicha masa puede tener una humedad comprendida 77-83% p/p. Además, en esta realización preferida, teniendo en cuenta la humedad relativa del material de partida, la cantidad proporcional de Kg agua / Kg alga que se introduce en el reactor de la etapa (a) está comprendido entre 0,5-7.

Dentro del ámbito de protección del método reivindicado, en la etapa de maceración la mezcla obtenida en el paso (a) se realiza durante un periodo de tiempo de 0,5 a 48 horas, siendo aun más preferido, un periodo de tiempo comprendido entre 2 a 20 horas, y aun más preferido en un tiempo comprendido entre 3 y 12 horas. Por otro lado, dicha maduración se lleva a cabo a una temperatura que puede estar comprendida entre 40-98 °C, siendo en una realización preferida entre 60 y 95°C, y aun más preferida, entre 70 y 95°C.

En realizaciones particulares de la invención, el método podrá comprender adicionalmente una etapa donde la fase líquida obtenida en la etapa (c) se puede estabilizar añadiendo 0,1 a 1,5% p/p de un conservante acuoso propio del ámbito de la presente invención cuyo fin es el control microbiológico en sistemas muy susceptibles a contaminarse. En una realización preferida de la presente invención, el conservante empleado puede ser del tipo acuoso y que además comprende en su composición base compuestos heterociclos y aldehídos desinfectantes. Dicho uso del conservante tiene como objetivo alargar la vida útil del producto, controlando el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo que pueda crecer en dicho extracto deteriorando su composición.

En realizaciones particulares de la invención el método podrá comprender adicionalmente una etapa donde la fase sólida obtenida en el paso (c) se macera de nuevo con una cantidad de agua comprendida entre 0,1-10 veces la cantidad de sólidos

presentes en el extractor, durante un periodo de tiempo de 0,5 a 48 horas a una temperatura entre 40 a 98°C, obteniéndose una nueva fase líquida y una nueva fase solida. Tras esta etapa, la nueva fase líquida puede ser utilizada en el paso (a) sustituyendo la cantidad proporcional de agua empleada en dicho paso (a), repitiendo nuevamente el proceso de obtención de extracto. Por otro lado, la fase solida obtenida en dicho paso puede ser reutilizada como fertilizante o alimentación animal, y en último término, desechada.

Por otro lado, en una realización preferida del método reivindicado, la filtración de la fase líquida obtenida en el paso (c) se realiza a través de un filtro de malla de diámetro conocido, siendo dicho diámetro preferido de hasta un máximo de 80 µm, siendo aún más preferido un tamaño máximo de 50 µm.

Una de las características principales que diferencian el método objeto de la invención con los métodos que existen en el estado de la técnica descritos con anterioridad en el presente documento es que el material de partida se somete al proceso de extracción sólido-líquida, a una elevada temperatura y en presión atmosférica.

Además, otra característica ventajosa del proceso reivindicado es que gracias a su configuración, el material de partida puede ser tanto material de alga deshidratada, como material de alga fresca, obteniéndose en ambos casos un alto rendimiento de extracción del extracto.

	Proceso objeto de la invención	Proceso de la patente Núm. ZA201300362(B)
Presentación de la materia prima (alga)	Deshidratada o fresca	Fresca
Presión al inicio	Atmosférica	400-600 bar
Presión al finalizar el proceso	Atmosférica	Atmosférica

Tabla 1. Comparativa del método de la solicitud de patente Núm. ZA201300362(B), con respecto al método descrito en el presente documento.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el método objeto de la invención se presenta como una alternativa a los métodos de obtención de extracto de alga que

existen actualmente en el estado de la técnica, siendo totalmente novedoso y con una serie de ventajas que se indican a continuación.

La principal ventaja del método reivindicado es que se puede extraer una
5 concentración de materia activa más elevada a la que se obtiene con los métodos conocidos y particularmente, con el método definido por la patente Núm. ZA201300362(B). La principal causa de la limitación del proceso desarrollado por la empresa Kelp Products International es que la concentración final de su producto está limitada por la proporción materia activa/ humedad de la materia prima de la que se parte
10 inicialmente en el método de extracción ya que el extracto se obtiene directamente del alga fresca, sin concentrar o añadir agua.

Por el contrario, el método objeto de la invención permite variar los parámetros de extracción para obtener una concentración deseada, independientemente de la calidad
15 de la materia prima o la humedad que presente el alga.

Asimismo, el método reivindicado permite obtener diferentes rangos de concentración, ya que dicho método permite variar la temperatura y la proporción de agua/alga, permitiendo a su vez controlar la riqueza del extracto obtenido
20 independientemente de la calidad de las algas que empleen como materia prima.

Cabe destacar que el método reivindicado, tal y como se ha indicado anteriormente en el presente documento, se realiza en condiciones de presión atmosférica, mientras que los métodos que existen actualmente en el estado de la técnica se emplean
25 presiones comprendidas entre 400 y 600 bares.

También es objeto de la presente invención el extracto de alga que se obtiene por el método reivindicado. En una realización particular del método reivindicado, cuando la materia prima empleada es el alga es *Ecklonia maxima*, se obtiene un extracto de algas
30 que presenta una actividad auxínica y citoquinética sorprendentemente elevadas, tal y como se muestra en los ejemplos 3 y 4 del presente documento.

Las auxinas son hormonas vegetales que promueven el crecimiento facilitando el alargamiento celular a través de sus efectos sobre los componentes de la pared
35 celulares. Además, pueden promover la división celular y están involucradas en el

desarrollo de raíces laterales y adventicias. Sin embargo, altas concentraciones de esta hormona pueden tener también un efecto negativo sobre el crecimiento. El crecimiento del fruto es otro fenómeno controlado por las auxinas, junto con la dominancia apical de la yema terminal.

5

Las citoquininas son fitohormonas que promueven la división celular de los tejidos. En plantas maduras, uno de los principales lugares de síntesis es la raíz, desde donde viajan a la parte aérea a través del xilema. Asimismo, las citoquininas tienen un efecto antisenescente o de mantenimiento de la juvenilidad. Este efecto viene producido por

10 conservar los niveles de clorofila, proteínas y de ácidos nucleicos, probablemente porque disminuyen su tasa de degradación y también porque mantienen la integridad de las membranas. A su vez se ha descrito la movilización de nutrientes inducida por citoquininas, así como la promoción del desarrollo de cloroplastos. Estas hormonas también están involucradas en la promoción del crecimiento de yemas laterales, y por lo

15 tanto, en la inhibición de la dominancia apical. Las citoquininas mas conocidas son la kinetina y la zeatina.

Finalmente, también es objeto de la presente invención el uso de un producto obtenido por el método reivindicado para la preparación de bioestimulantes agrícolas.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Para una mejor comprensión de la presente memoria descriptiva, se acompañan las siguientes figuras, a modo ilustrativo y no limitante de la invención:

- 25 • **Figura 1** muestra las hojas primarias de plantas de alubia sumergidos en los distintos tratamientos de soluciones de ácido indolacético (AIA) y del extracto obtenido por el método reivindicado al producto a testar, manteniendo 1 cm del peciolo de las hojas.
- **Figura 2** muestra las hojas de alubia en placas Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada.
- 30 • **Figura 3** se muestra el desarrollo de raíces adventicias en peciolos de hojas de alubia tratadas con el extracto obtenido por el método reivindicado.
- **Figura 4** es un gráfico donde se muestra el número de raíces adventicias que se han desarrollado en las hojas de alubia expuestas con respecto a los tratamientos T, E, E 1:2 y E 1:5.
- 35 • **Figura 5** se muestra el desarrollo de callo (a) y raíces adventicias (b) en los

peciolos de hojas de alubia tratadas con el extracto obtenido por el método reivindicado.

- **Figura 6** es un gráfico donde se muestra la relación entre las variables número de raíces adventicias y concentración de AIA tras 2 semanas de tratamiento.
- 5 • **Figura 7** muestra el bioensayo de actividad citoquinética basado en el mantenimiento de la concentración de clorofilas. Los tratamientos analizados fueron de izquierda a derecha y de arriba a abajo: E, E 1:2, E 1:5, T, K -2, K -3, K -4, K -5, K -6.
- 10 • **Figura 8** es un gráfico donde se muestra la concentración de clorofilas totales en hojas de espinaca expuestas durante una semana con respecto a los tratamientos T, E, E 1:2 y E 1:5.
- **Figura 9** muestra el estado de clorosis de los discos de hoja de espinaca tras una semana en condiciones de oscuridad. Los tratamientos que se comparan en la imagen son de izquierda a derecha: T, K -3, E y E 1:2.
- 15 • **Figura 10** muestra los discos de hojas de espinaca tras una semana de tratamiento a oscuridad. Los tratamientos mostrados de izquierda a derecha y de arriba abajo son: T, KIN -3, KIN -4, KIN -5, KIN -6, E y E 1:2.
- **Figura 11** es un gráfico que muestra la relación entre las variables concentración de clorofilas totales y Kinetina.

20

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Con objeto de contribuir a una mejor comprensión de la invención, y de acuerdo con una realización práctica de la misma, se acompaña como parte integrante de esta descripción una serie de ejemplos: una realización preferida del método reivindicado, un
25 estudio comparativo del extracto obtenido por el método en respecto a otros productos que se encuentran en el mercado, así como unos estudios de actividad auxínica y citoquinética del extracto obtenido por el método reivindicado.

Ejemplo 1: Método para la obtención de un extracto de algas donde la materia 30 prima es el alga *Ecklonia maxima*.

A continuación, se muestra una realización preferida del método que se describe en el presente documento donde la materia prima es el alga *Ecklonia maxima*. Dicho método comprende las siguientes fases:

- 35 (a) Introducir masa de **alga deshidratada** con una humedad comprendida entre 5 a

15% p/p en un reactor con agua en una cantidad proporcional Kg agua / Kg alga de 9,29,

(b) dejar macerar la mezcla obtenida en el paso anterior durante un periodo de tiempo de 3 a 6 horas a temperatura de entre 80-90°C y, seguidamente, separar la fase sólida de la fase líquida cuando la fase líquida ha alcanzado el residuo seco de entre 1,9 a 2,1 % p/p,

(c) estabilizar la fase líquida obtenida en el paso anterior añadiendo 0,5 % p/p de un conservante, y a continuación, se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro que sea igual o superior 80 µm.

Ejemplo 2: Comparativa del extracto obtenido por el método reivindicado cuando la materia prima es el alga *Ecklonia maxima*.

Partiendo del extracto obtenido por el método descrito en el ejemplo 1, se procede a hacer una comparativa de su composición con respecto a los otros extractos obtenidos de *Ecklonia maxima* que actualmente existen en el mercado y que se emplean como bioestimulantes.

	Extracto de la empresa Afrikelp	Extracto de la patente Núm. ZA201300362(B)	Extracto de <i>Ecklonia maxima</i> obtenido en ejemplo 1
Ácido Algínico (% p/p)	0,508	0,680	2,755
Laminarina (% p/p)	0,035	0,044	0,200
Fucoidano (% p/p)	0,035	0,035	0,295
Manitol (% p/p)	0,200	0,155	0,914
Betainas (% p/p)	0,001	0,002	0,012
Giberelinas (ppm)	0,765	0,500	4,800
Citoquininas (ppm)	0,480	0,600	5,555
Auxinas (ppm)	0,500	0,512	4,568

Tabla 2. Comparativa de composición de los distintos productos que existen en el mercado que consisten en extractos obtenidos de *Ecklonia maxima* con respecto a extracto de *Ecklonia maxima* obtenido en ejemplo 1.

Ejemplo 3: Estudio sobre la actividad auxínica del extracto de *Ecklonia maxima*

obtenido por el método reivindicado y descrito en el ejemplo 1.

Para poder determinar la actividad auxínica del extracto de *Ecklonia maxima* obtenido por el método reivindicado, se emplearon hojas que fueron sumergidas en distintos tratamientos y diluciones del extracto obtenido por el método reivindicado. Cabe aclarar en este punto que algunas plantas producen de forma espontánea raíces en las terminaciones de las hojas escindidas o de las estaquillas. Sin embargo, en otras muchas especies no se desarrollan raíces, y el tratamiento con auxinas les permitirá dicha formación.

La auxina natural en las plantas es una sustancia muy simple, el ácido indolacético (AIA). Este compuesto se sintetiza en la planta a partir del aminoácido triptófano. A nivel viverístico, para la propagación vegetativa se emplean auxinas sintéticas como el ácido indolbutírico (AIB) y ácido naftaleacético (ANA).

En base a esto, para los ensayos de actividad auxínica del extracto obtenido por el método reivindicado, se emplearon hojas primarias de plantas de alubia que fueron tratadas con soluciones de AIA de concentración conocida junto al producto a testar, manteniendo 1 cm del peciolo de las hojas sumergidos durante 2 horas en dicha solución (Figura 1). Tras estas 2 horas, las hojas escindidas fueron transferidas a placas de Petri con papel de filtro humedecido con agua destilada (Figura 2). Las placas se mantuvieron durante 2 semanas con luz difusa y a temperatura ambiente en el laboratorio. Transcurridas las 2 semanas, se analizó el desarrollo de raíces en hojas aisladas mediante la determinación del número de raíces formadas.

Los tratamientos a los que fueron sometidas las hojas son los siguientes:

- Testigo (T) (agua destilada)
- Extracto sin diluir (E)
- Extracto dilución 1:2 (E 1:2)
- Extracto dilución 1:5 (E 1:5)
- AIA 100 µg ml⁻¹ (AIA 100)
- AIA 10 µg ml⁻¹ (AIA 10)
- AIA 1 µg ml⁻¹ (AIA 1)
- AIA 0,1 µg ml⁻¹ (AIA 0,1)

Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante el programa IBM SPSS (v. 24) a través de un análisis de la varianza ANOVA de un factor y el test a posteriori Tukey-b ($p \leq 0,05$).

5 Tal y como se observa en la Figura 3, el extracto obtenido por el método reivindicado resultó significativamente eficaz induciendo el desarrollo de raíces en peciolo de hojas de alubia. Además, dicho efecto fue independiente de la dilución del producto empleado (Figura 4). Cabe destacar que el tratamiento testigo no presentó desarrollo alguno de raíces.

10

Tras dos semanas del tratamiento con auxinas o el extracto, los peciolo de las hojas de alubia mostraron en algunos casos el desarrollo de raíces adventicias en mayor o menor grado, desde la formación de callo a raíces bien diferenciadas (Figura 5).

15

Si se establece la correlación entre el número de raíces desarrolladas en las hojas escindidas y la concentración de AIA conocida aplicada a los peciolo de las hojas, podremos extrapolar la actividad auxínica del producto testado. En la Figura 6 se muestra la relación matemática entre ambas variables, tras la cual, se calculó la concentración equivalente de auxinas del producto y sus diluciones.

20

Los resultados de la actividad auxínica del producto se muestran en la Tabla 4:

Producto	Equivalencia Auxinas (ppm)
E	33,27±9,75 a
E 1:2	20,89±9,00 a
E 1:5	28,93±10,81 a

Tabla 4. Concentración de auxina equivalente del extracto obtenido por el método reivindicado.

25

El extracto obtenido por el método reivindicado presentó una actividad auxínica equivalente a 25 ppm, entendiendo esta actividad no como la concentración de auxinas presentes en el producto, sino como su capacidad de estimular el desarrollo de raíces. Esta respuesta resultó independiente a la dilución del producto empleada.

30

Ejemplo 4: Estudio sobre la actividad citoquinética del extracto de Ecklonia

maxima obtenido por el método reivindicado y descrito en el ejemplo 1.

Para poder determinar la actividad citoquinética del extracto de *Ecklonia maxima* obtenido por el método reivindicado, se emplearon hojas escindidas de espinacas.

5

Las hojas escindidas sufren una irreversible pérdida de clorofilas que se traduce en una clorosis, además de reducir su contenido en proteínas y ácidos nucleicos. Este progresivo proceso senescente puede retrasarse mediante la aplicación de citoquininas, siendo la concentración de clorofilas mantenida proporcional a la concentración de hormona aplicada.

10

En este estudio en particular, se obtuvieron discos de hojas de las hojas de espinaca de área conocida con sacabocados para su mantenimiento en placa de Petri. Se añadieron 20ml de la solución correspondiente a cada placa de Petri, en la que se colocaron los discos de hoja con el envés en contacto con la solución (Figura 7). Las placas de Petri se mantuvieron durante una semana a oscuridad, tras la cual se cuantificó espectrofotométricamente la concentración de clorofilas totales (clorofilas a+b) previa extracción en etanol al 96% y en baño termostatzado a 80 °C.

15

20 Los tratamientos comparados fueron:

- Testigo (T) (agua destilada)
- Extracto sin diluir (E)
- Extracto dilución 1:2 (E 1:2)
- Extracto dilución 1:5 (E 1:5)
- Kinetina 10⁻² M (K -2)
- Kinetina 10⁻³ M (K -3)
- Kinetina 10⁻⁴ M (K -4)
- Kinetina 10⁻⁵ M (K -5)
- Kinetina 10⁻⁶ M (K -6)

25

30

Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante el programa IBM SPSS (v. 24) a través de un análisis de la varianza ANOVA de un factor y el test a posteriori Tukey-b ($p \leq 0,05$).

35

Tal y como se observa en la Figura 8, el extracto obtenido por el método del

ejemplo 1 resultó significativamente eficaz retrasando la senescencia foliar determinada como la degradación de clorofilas tras una semana de escisión del tejido y en condiciones de oscuridad. La dilución del producto con el factor 1:5, aun reduciendo la concentración de clorofilas en comparación con el producto sin diluir, mostró un significativo efecto antisenescente. En la Figura 9, se puede observar la comparativa del estado de clorosis de los discos de hoja tras la semana que dura el bioensayo. Mientras el tratamiento control mostro signos claros de clorosis, tanto las altas concentraciones de Kinetina como el extracto obtenido en el ejemplo 1 permitieron reducir dicha senescencia. La comparativa visual de todos los tratamientos se muestra en la Figura 10. La disminución en la degradación de clorofilas provocada por el producto testado, podría suponer un mejor mantenimiento de la tasa fotosintética y por lo tanto, de la producción.

Por otro lado, si se establece la correlación entre la concentración de clorofilas presente en las hojas en función de una concentración de Kinetina conocida aplicada, se puede extrapolar la actividad citoquinética del producto testado. En la figura 11 se muestra como ejemplo una de las correlaciones establecidas entre ambas variables. Una vez establecida la relación matemática entre ellas, se calculo la concentración equivalente de Kinetina del producto y sus diluciones. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Producto	Equivalencia [Kinetina] ppm
E	2799,12 ± 313,89 a
E 1:2	2119,98 ± 205,00 ab
E 1:5	1313,47 ± 85,47 b

Tabla 5. Concentración de Kinetina equivalente de extracto obtenido en el ejemplo 1.

La concentración equivalente de Kinetina del extracto obtenido en el ejemplo 1 es del orden de 2500ppm (Tabla 4), entendiendo esta actividad citoquinética no como la concentración de citoquininas en el producto, sino como su capacidad antisenescente retrasando la degradación de clorofilas. Como cabria esperar, esta actividad disminuye significativamente cuando el producto se diluye 5 veces.

Ejemplo 5: Método para la obtención de un extracto de algas donde la materia prima es el alga *Ecklonia maxima* fresca.

A continuación, se muestra una realización preferida del método que se describe en el presente documento donde la materia prima es el alga *Ecklonia maxima*. Dicho método comprende las siguientes fases:

- 5 (a) Introducir masa de **alga hidratada** con una humedad comprendida entre 70 a 85% p/p en un reactor con agua en una cantidad proporcional Kg agua / Kg alga de 0,5 - 1,5,
- (b) dejar macerar la mezcla obtenida en el paso anterior durante un periodo de tiempo de 3 a 6 horas a temperatura de entre 80°C-90°C y, seguidamente,
- 10 (c) separar la fase sólida de la fase líquida cuando la fase líquida ha alcanzado el residuo seco de entre 1,9 a 2,1 % p/p,
- (d) estabilizar la fase líquida obtenida en el paso anterior añadiendo 0,5 % p/p de un conservante, y a continuación, se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro que sea igual o superior 80 µm.