



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**“ OPTIMIZACIÓN EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE AGAR DE
Gracilariopsis lemaneiformis DEL GOLFO DE CALIFORNIA
MEDIANTE UN TRATAMIENTO ALCALINO ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

O C E A N O L O G O

PRESENTA

JAVIER ALEJANDRO GONZÁLEZ LEIJA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, JUNIO DEL 2002.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

**“ OPTIMIZACIÓN EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE AGAR DE
Gracilariopsis lemaneiformis DEL GOLFO DE CALIFORNIA
MEDIANTE UN TRATAMIENTO ALCALINO ”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL
TITULO DE
O C E A N O L O G O
PRESENTA:
JAVIER ALEJANDRO GONZÁLEZ LEIJA**

ENSENADA, B.C., 20 DE JUNIO DEL 2002.

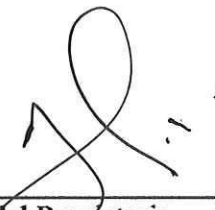
“ OPTIMIZACION EN EL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE AGAR DE *Gracilariopsis*
lemaneiformis DEL GOLFO DE CALIFORNIA MEDIANTE UN TRATAMIENTO
ALCALINO “

TESIS
QUE PRESENTA:
JAVIER ALEJANDRO GONZÁLEZ LEIJA

Aprobada por:



Presidente del Jurado
M.C. Enrique Hernández Garibay



Sinodal Propietario
Dr. Isai Pacheco Ruiz



Sinodal Propietario
M.C. Felipe Correa Díaz.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se lo dedico con amor a mi familia, a mi madre Rosa María Leija Sosa, a mi segunda madre, mi tía Dra. Ma. Luisa González Varela por todo el apoyo y amor incondicional que me han dado, por lo que me han enseñado, siempre han estado conmigo, va por ustedes. A mi hermana Mariana por su apoyo y cariño incondicional, gracias hermanita, y a mi hermano Luis Esteban que lo quiero.

En especial a Gabriela, por tu presencia, apoyo, comprensión, aceptación, en especial paciencia y amor que me tuviste en todo este tiempo que hemos estado juntos...Te amo.

Agradezco también a todos mi compañeros de la carrera, a mis compañeros de la LII generación (Sharkologos) a la familia que formamos a pesar de que pasamos momentos amargos, al final seguimos aquí.

Gracias a las personas que estuvieron más cerca de mí durante todos estos años y que nos unimos para ser hermanos, a ti Popoca, Diego, Poncho, Quique, Giaco, Edith, a las Miriams, Gaby (Medellín), Julio, Arturo, a los chilangos (Edgar, Angel), Dany, Mochis, Mauricio y aunque no es de la generación tiene un lugar chido, Ever, Javier, Puga, a David Lora, por la amistad y apoyo que me han brindado, y por todos los momentos que vivimos durante la carrera... los llevaré siempre en mí mente y en mi corazón.

A los maestros de la carrera, a pesar de que no son todos buenos, sembraron su semilla en mí y cambiaron mi forma de ver la vida y el mundo, Pancho, Pinal, Moreno, Ledezma, Cupul, Enrique, Chato, Chief.

Al mar.....

LISTA DE TABLAS

Tabla I. <u>Tipo de variables utilizadas en el primer experimento (60 minutos)</u>	17
Tabla II. <u>ANOVA para rendimiento (60 minutos)</u>	23
Tabla III. <u>ANOVA para la fuerza de gel (60 minutos)</u>	25
Tabla IV. <u>ANOVA para rendimiento a condiciones óptimas</u>	27
Tabla V. <u>ANOVA para fuerza de gel a condiciones óptimas</u>	29
Tabla VI. <u>Prueba de Tukey para tratamiento óptimo</u>	29
Tabla VII. <u>ANOVA para 3,6 anhidrogalactosa y sulfatos</u>	31
Tabla VIII. <u>Coeficientes de Pearson para 3,6 AG, sulfatos y f. de gel</u>	31
Tabla IX. <u>Valores de punto de fusión, gelificación e histéresis</u>	33

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 <u>Estructura idealizada del disacárido de agar nativo</u>	6
Fig. 2 <u>Estructura idealizada del disacárido de agar</u>	7
Fig. 3 <u>Cambio conformacional de la molécula de agar por efecto del álcali</u>	11
Fig. 4 <u>Localización del área de colecta</u>	15
Fig. 5 <u>Rendimiento a tiempo constante</u>	23
Fig. 6 <u>Fuerza de gel a tiempo constante (Miller y Furneaux)</u>	24
Fig. 7 <u>Fuerza de gel (Nikán)</u>	25
Fig. 8 <u>Rendimiento a condiciones óptimas variando tiempo</u>	26
Fig. 9 <u>Fuerza de gel a condiciones óptimas variando tiempos</u>	28
Fig. 10 <u>Fuerza de gel a condiciones óptimas variando tiempos (Nikán)</u>	28
Fig. 11 <u>Contenido de 3,6 AG y sulfatos variando tiempo a condiciones óptimas</u>	30

RESUMEN

Se analizó el efecto que tiene la aplicación de un tratamiento alcalino en el rendimiento, fuerza de gel, reología y características químicas del agar de *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory) Dawson, Acleto et Foldvik encontrando las condiciones óptimas de concentración de álcali, temperatura y tiempo de pretratamiento alcalino para esta especie, a fin de obtener las mejores características de agar. Las variaciones de concentración de NaOH, temperatura y tiempos de pretratamiento alcalino, afectan el rendimiento y la fuerza de gel. Los parámetros que se probaron fueron: a) Concentración de NaOH (2.5, 3.0, 4.0, 5.0 y 6.0 %) b) Temperatura (80, 90 y 100 °C) y c) Tiempo (constante en la primer etapa (1hr)); los óptimos de rendimiento y fuerza de gel encontrados con estas condiciones fueron concentración de NaOH de 4.0 y 5.0 % a temperaturas de 90 y 100 °C. En una segunda etapa, con las condiciones óptimas encontradas, se varió el tiempo a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. El rendimiento máximo de 24.36 % se obtuvo con NaOH 5.0 % a 90 °C por 15 minutos de tratamiento; el rendimiento mínimo de 15.5 % correspondió a NaOH 5 %, 100 °C a 120 minutos. La máxima fuerza de gel fue de 1646 g cm⁻² (954 g cm⁻² Nikán) a 100 °C, 5.0 % de NaOH y 90 min. y la mínima de 270 g cm⁻² (156.5 g cm⁻² Nikán) con NaOH 5.0 %, 90 °C y 15 minutos de tratamiento; el óptimo general encontrado fue NaOH al 5.0 %, temperatura 100 °C y tiempo de 90 minutos. La fuerza de gel, contenido de 3,6 anhidrogalactosa, sulfatos, reología e histéresis del agar obtenido con las condiciones de tratamiento alcalino óptimas, caen dentro de los requerimientos del agar comercial.

INTRODUCCION

De acuerdo con la US Pharmacopeia y la Food Chemicals Codex (US PFCC), el agar se define como un coloide hidrofílico, insoluble en agua fría, pero soluble en agua caliente. Esta solución al 1.5 % es clara y forma geles firmes entre los 32 y 39 °C y estos no se funden por debajo de los 85 °C.

El agar se obtiene de las algas rojas pertenecientes a los géneros *Ahnfeltia*, *Gelidium*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis* y *Pterocladia* (Kloareg y Quatrano, 1988). Sin embargo aproximadamente el 60 % de la producción mundial de agar, se deriva de las algas del género *Gracilaria* (Armisen, 1995).

El agar se emplea como estabilizante o gelificante en preparaciones alimenticias (Lewis *et al.*, 1988), así como en la industria farmacéutica en ciertas formulaciones de medicamentos (Indergaard y Ostgaard, 1991). Además, el agar se ha convertido en el mejor gel termoreversible solidificable en bacteriología (Womer, 1982), en los últimos 20 años, la agarosa ha jugado un importante papel dentro de la biotecnología, encontrando diversos nichos de aplicación (Hjerten, 1962; Matsunaga *et al.*, 1980; Womer, 1982; Renn, 1984; Guiseley, 1987; Renn, 1990).

Está compuesto por dos fracciones: agarosa y agarpectina (Fig. 1). La *agarosa* posee una baja densidad de cargas, es soluble en agua y tiene capacidad gelificante, mientras que la *agarpectina* es la fracción con un alto contenido de grupos iónicos y baja capacidad gelificante (Araki, 1944).

La agarosa es un polímero lineal compuesto por la sucesión de dos unidades alternantes que se mezclan en una estructura repetitiva llamada agarobiosa (O- β -D-galactopiranososa y O- α -L-3,6-anhidrogallactopiranososa) con enlaces β (1-4) y α (1-3) respectivamente; la agaropectina está compuesta por β -D-galactosa, 3,6-anhidrogallactosa (AG), ésteres de sulfato, que pueden llegar hasta un 5.0 %, ácido D-glucurónico y ácido pirúvico (Araki, 1966) (Fig.2).

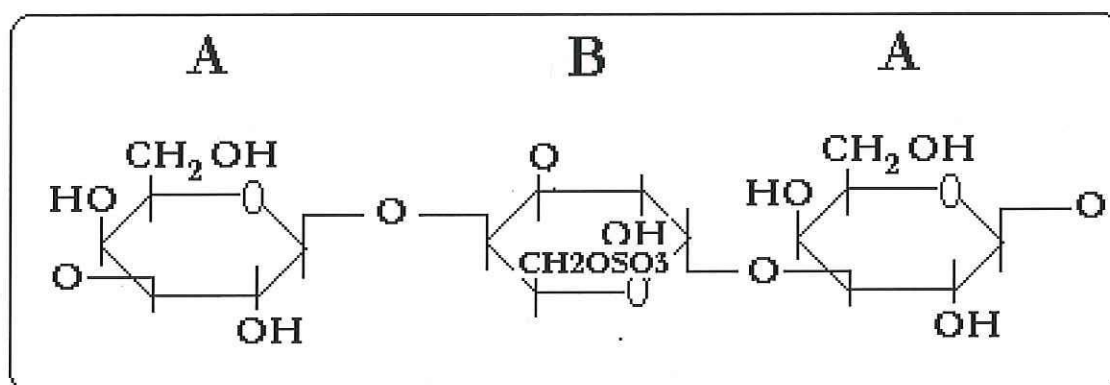


Figura 1.- Estructura repetitiva del agar nativo.

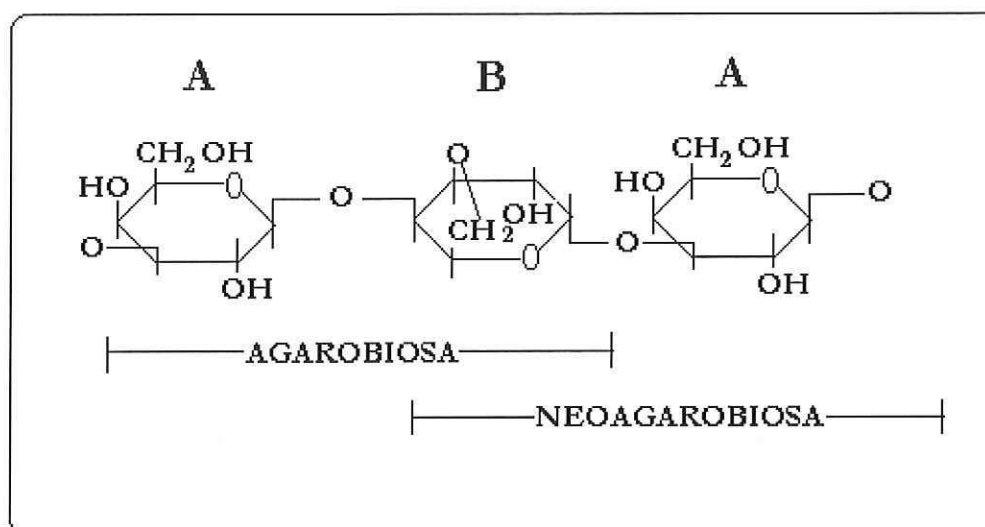


Figura 2.- Estructura repetitiva idealizada de la molécula del agar.

La capacidad de conformar hélices dobles y formar una red tridimensional que inmoviliza al agua y produce el estado de gel esta dada por la fracción agarosa (Arnott *et al.*, 1974; Rees, 1969). En particular, el comportamiento de las características reológicas del agar están determinadas por la alternancia regular de D-galactosa y residuos de 3,6-anhidro-L-galactosa, el contenido y posición de grupos sustituyentes y el peso molecular (Rees, 1972; Armisén y Galatas, 1987).

ANTECEDENTES

En el Golfo de California existen al menos 55 especies de importancia económica que incluyen varias especies endémicas. De estas especies, 19 presentan una alta potencialidad a ser explotadas; principalmente los géneros *Gracilaria*, *Gracilariopsis* y *Pterocladia*, donde *Gracilariopsis* es la más abundante (Espinoza-Avalos, 1993; Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 1996; Zertuche-González, 1988; Pacheco-Ruíz *et al.*, 2002).

Gracilariopsis lemaneiformis (Bory) Dawson, Acleto et Foldvik es una alga roja productora de agar, que forma extensos mantos en la zona submareal (Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 1996). Investigaciones sobre ciertas especies de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* en el Golfo de California han producido información sobre su taxonomía y distribución (Setchell y Gardner, 1924; Dawson, 1949; Norris, 1975; Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 1996), evaluación de la biomasa disponible (Pacheco-Ruíz y Zertuche-González, 2002) y características de su agar (Arellano-Carbajal *et al.*, 1999).

G. lemaneiformis existe en volúmenes comerciales desde Bahía de los Ángeles (29° 02' 44" N, 113° 32' 09" W) hasta La Trinidad (27° 49' 18" N, 112° 43' 24" W) aproximadamente 350 km. de costa. Esta región posee varias bahías con fondo arenoso donde *G. lemaneiformis* forma mantos unialgales localizados principalmente a profundidades de 2 a 7 metros (Pacheco-Ruíz *et al.*, 1999).

Desde hace varios años la importancia comercial de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* ha ido en aumento debido a que se emplea en la obtención de

agar grado alimenticio. La disponibilidad de esta importante materia prima, se ha incrementado debido al desarrollo de cultivos a gran escala por países como Chile, China, Taiwan, Filipinas etc., siendo el primero el mayor exportador a nivel mundial. En México, así como en países como Namibia y Venezuela se ha comenzado a cultivar a escala piloto, o a explotar en forma racional mantos naturales de algas pertenecientes a estos géneros (Armisen, 1995; Zertuche-González 1994; Pacheco-Ruíz *et al.*, 2002).

En general, las agarofitas presentan variación estacional en rendimiento, síntesis, química y calidad del agar (Oza, 1978; Yang y Wang, 1983; Cote y Hanisak, 1986; Luhan, 1992; Bird y Hinson, 1992; Rebello *et al.*, 1996; Freile-Peigrín y Robledo, 1997a), por el efecto de factores ambientales tales como: temperatura, nutrientes, fase reproductiva del alga (Kim y Enríquez, 1978; Lahaye y Rochas, 1991), condiciones de cultivo y los métodos de extracción-purificación que aplique el productor (Armisen, 1993; Lahaye y Rochas, 1991).

Generalmente, las especies de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* producen agares con una baja calidad debido al mayor grado de sulfatación que los obtenidos de especies de *Gelidium* y *Pterocladia*, por lo que se denominan agaroides (Craigie, 1990).

Sin embargo, aunque la cantidad de grupos hemiéster sulfatos en agarocoloides de algunas especies pueden alcanzar valores tan altos como de 14 % (peso húmedo) ej. *Gracilaria textorii* (Suro) De-Toni (Craigie *et al.*, 1984) y 16 % (peso húmedo), *Gracilaria abottiana* (Abbott) (Santos y Doty, 1983), el

contenido de sulfatos es considerablemente más bajo que los coloides tipo "carragenano" (Craigie *et al.*, 1978).

El patrón de sulfatación de los agares de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* esta dominado por la esterificación del carbono 6 (C-6). La α , L-galactosa 6-sulfato se sintetiza en el alga como un precursor biológico de la 3,6-anhidrogalactosa y es convertida a la forma anhidro por efecto de enzimas sulfhidrolíticas (Rees, 1961; Wong y Craigie, 1978).

La calidad del agar depende de sus propiedades físicas como: temperatura de fusión, gelificación, viscosidad, fuerza de gel (Tsuchiya y Hong, 1966) y composición química como el contenido de grupos sulfatos y porcentaje de 3,6-anhidrogalactosa (Lahaye y Rochas, 1991).

Desde el desarrollo del tratamiento alcalino en agares, cuyo efecto es convertir la L-galactosa-6-sulfato a 3,6-anhidro-L-galactosa, para mejorar las características de gelificación (Duckworth y Yaphe, 1971; Rees, 1972), este tratamiento ha sido utilizado por los productores de agar de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* (Minghou, 1990) (Fig. 3).

El pretratamiento alcalino ha sido aplicado en la obtención de agar de diferentes especies de *Gracilaria*, variando la concentración de álcali, temperatura y tiempos, procurando la mayor desulfatación posible, con la menor pérdida de rendimiento que el proceso causa (Armisen y Galatas, 1987).

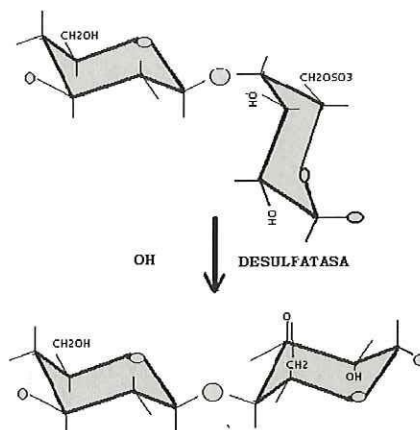


Figura 3.- Cambio conformacional de la molécula de agar por efecto del tratamiento alcalino (4C1–1C4 a 4C1–4C1).

Se han empleado soluciones de NaOH a concentraciones que van desde 1.0 % hasta 25.0 % (P. Lian y Q. Zhang, 2000), temperaturas de 50 a 90 °C con tiempos de 30 a 180 minutos (Minghou, 1990; Villanueva *et al.*, 1997).

Villanueva *et al.*, (1997), optimizó la extracción de agar de *Gracilaria eucheumoides* (Harvey), al variar los 3 parámetros citados en un tratamiento alcalino encontró que el rendimiento de agar es alto a bajas temperaturas, combinado con una solución alcalina fuerte y un tiempo de tratamiento corto. Mientras que, temperaturas altas y concentraciones de álcali altas, con prolongados tiempos de tratamiento, produjeron un alto contenido de 3,6-AG, y bajo contenido de sulfatos; las condiciones óptimas encontradas en el citado estudio fue NaOH al 10.0 % a temperatura de 90 °C por 120 minutos de tratamiento.

En *G. lemaneiformis* de Carolina del Norte, USA, el agar en forma nativa puede pasar, de no tener capacidad gelificante, hasta alcanzar fuerzas de gel superiores a 1300 g cm^{-2} al someterla a un tratamiento alcalino con NaOH al 4.0 % a 80°C por 60 minutos (Bird y Hinson, 1992); en *G. lemaneiformis* (Bory) Acleto *et* Foldvik del Golfo de California, Arellano-Carbajal *et al.*, (1999) emplearon un tratamiento alcalino con NaOH al 2.5 % a 90°C durante 60 minutos, reportando un agar con una fuerza de gel máxima de 892 g cm^{-2} .

Estos antecedentes permiten ver que, la optimización de los parámetros implicados en el tratamiento alcalino para obtener el máximo rendimiento con la mayor calidad del gel, deben ser adaptados para cada especie de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* en particular, variables como la temperatura y la concentración del álcali deben ser ajustadas para obtener la mayor desulfatación posible.

Por ello debería ser prioritario encontrar las condiciones apropiadas para optimizar el rendimiento en la extracción de agar para cada especie de importancia comercial, así como determinar el tratamiento óptimo para obtener las mejores fuerzas de gel. Por esto el presente estudio se encamina a encontrar la combinación óptima de parámetros como temperatura, concentración de NaOH y tiempo, a fin de obtener el mayor rendimiento y la mejor calidad de agar.

Hipótesis:

Al variar las condiciones de concentración de álcali, temperatura y tiempos de tratamiento alcalino, se presentarán diferencias significativas en el rendimiento y fuerza de gel del agar de *G. lemaneiformis*.

OBJETIVOS**Objetivo general**

- Obtener agar de *G. lemaneiformis* con las mejores características de calidad y rendimiento mediante la utilización de un tratamiento alcalino.

Objetivo particular

Describir las condiciones físico-químicas que permiten optimizar el rendimiento y calidad de agar de *G. lemaneiformis*.

Comparar el agar nativo con el obtenido con tratamiento alcalino mediante:

- Las propiedades físicas: puntos de fusión y gelificación, fuerza de gel (reología)
- Composición química: contenido de 3,6-anhidrogalactosa y grupos hemiéster sulfato

METODOLOGÍA

Descripción del área de estudio y colecta de muestras

Las muestras de *G. lemaneiformis* se colectaron en mantos comerciales de Bahía de las Animas zona que se localizan en la costa NW del Golfo de California (28° 49' 00" N y 113° 21' 50" W) (Fig. 4)

La temperatura de la zona presenta amplias variaciones a lo largo del año, con valores máximos en verano y otoño (28-31 °C) y mínimos en invierno y primavera (14-22 °C) (Becerril-Bobadilla, 2001). Es una zona influenciada por surgencias provenientes de las aguas profundas del Canal de Ballenas y caracterizada por una fuerte mezcla por mareas (Roden y Groves, 1959; Bray y Robles, 1991), por lo que la concentración de nutrientes es relativamente alta sobre todo en invierno y primavera (Álvarez-Borrego *et al.*, 1978; Castro-Montoya *et al.*, 1987).

Las colecta se realizó de forma aleatoria en la zona submareal (a una profundidad aproximada de 3 metros) en sustrato arenoso, con equipo de buceo autónomo, por personal de la empresa AMARES S.A. DE C.V. durante el mes de marzo de 2001.

El material se secó al sol y se transportó al laboratorio del Instituto de Investigaciones Oceanológicas donde se deshidrató hasta peso constante en una estufa de convección a 60 °C durante 72 horas y se guardó en bolsas de plástico para su análisis posterior.

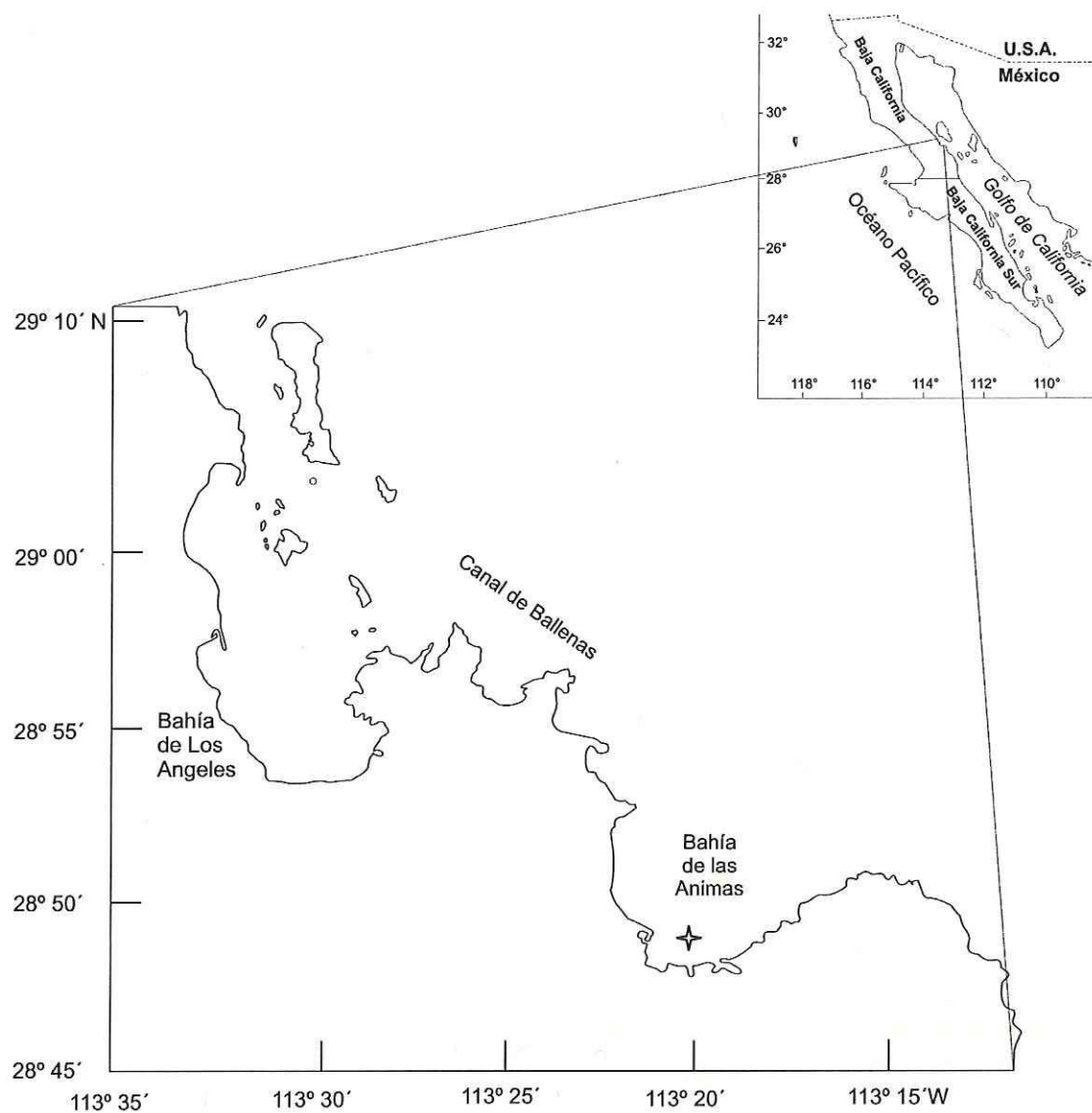


Figura 4.- Localización del área de colecta.

Obtención de agar:**a) Agar nativo**

Se prepararon por triplicado 5 gramos del alga seca sin moler, posteriormente se lavaron dos veces en 100 ml de agua destilada; y se colocaron en 150 ml de buffer de fosfatos pH 6.3 y se realizó la extracción durante una hora a 100 °C con agitación continua. El extracto resultante, se filtró a vacío a través de un filtro (Whatman® 40), empleando tierra de diatomeas como filtro auxiliar; el extracto se dejó enfriar hasta que gelificó, posteriormente se congeló y descongeló en dos ocasiones sucesivas y se drenó el líquido liberado. El gel resultante se lavó dos veces con etanol al 70 % durante 15 minutos y dos veces con etanol concentrado durante media hora. El producto obtenido se secó a 60 °C durante 72 horas y se peso.

b) Agar con tratamiento alcalino:**Obtención de variables óptimas:**

Antes de la extracción de agar, se aplicó a cada muestra de alga un tratamiento alcalino bajo 5 porcentajes de NaOH, tres temperaturas sobre cada condición y un solo tiempo (Tabla I).

Tabla I.- Tipo de variables utilizadas en el primer experimento.

Na OH %	T °C	TIEMPO (minutos)
2.5	80, 90 y 100	60
3.0	80, 90 y 100	60
4.0	80, 90 y 100	60
5.0	80, 90 y 100	60
6.0	80, 90 y 100	60

Una vez detectadas las variables óptimas en base a rendimiento y calidad de agar, se probaron las mismas condiciones, pero ahora variando el tiempo de tratamiento alcalino a 15, 30, 60, 90 y 120 minutos.

El procedimiento para este experimento fue utilizar 5 g de alga seca y entera, la cual se sometió a 150 ml de solución alcalina, se calentó en baño maría con control de temperatura o en plancha de calentamiento, según la temperatura requerida; se dejó enfriar y se lavó exhaustivamente con agua corriente por 5 minutos y posteriormente con 100 ml de H_2SO_4 al 0.025 % por 10 minutos, seguido de tres lavados más con agua destilada, donde se dejó reposar toda la noche. Al día siguiente se drenó el líquido y se le agregaron 150 ml de buffer de fosfatos pH 6.3; la extracción de agar se efectuó en autoclave por 60 minutos a 1.5 kg cm^{-2} de presión, la recuperación del agar se realizó como en el descrito para el agar nativo.

Análisis Físicos

Preparación de geles

Se prepararon soluciones de agar al 1.5 % disolviendo 0.3 g de agar en 20 ml de agua destilada, se empleó la autoclave a fin de asegurar la completa disolución de los geles. La solución caliente resultante se le ajustó el volumen y se vertió en dos viales de plástico de 5 ml en cada uno y 10 ml en un vaso de precipitados de 30 ml. Una vez que se formó el gel, se dejó reposar toda la noche a temperatura ambiente y se procedió a la medición de la fuerza de gel.

Fuerza de gel

La fuerza de gel se evaluó empleando dos métodos:

1).- Modificación del método descrito por Miller y Furneaux (1987), en el cual la fuerza de gel se define como la carga máxima requerida para romper la matriz del gel en la vecindad inmediata de la carga aplicada. La fuerza de gel (g cm^{-2}) se determinó empleando una balanza de dos platos usando un émbolo de 0.5 cm de diámetro (0.196 cm^2). El procedimiento consistió en colocar el émbolo sobre el gel y por el otro lado de la balanza, un vaso en donde se agrega agua a una velocidad constante de aproximadamente 200 g min^{-1} , de forma que se presiona el gel hacia el émbolo y se registra en la balanza digital el peso necesario para la ruptura del mismo. Para convertir la fuerza de gel a unidades Nikán, el valor obtenido se dividió entre un factor de conversión que fue de 1.725.

2).- Gelómetro Nikkan (Hispanoagar, 1967). La fuerza de gel también se determinó como la carga máxima que soporta el gel durante 20 segundos (unidades Nikan, g cm^{-2}). Cuando el gel no resiste un peso durante 20 segundos, se utiliza la siguiente ecuación para calcular el peso que resiste el gel: $\text{Log } w^{20} = \text{log } w + k (\text{log } t - \text{log } 20)$

Donde :

W^{20} = Núm. Máx. de gramos que puede soportar durante 20 segundos

W = Número de gramos de peso que resistió el gel

t = Número de segundos que resiste el gel cuando se agrega peso

$k = 0.18$

Punto de fusión

Se determinó siguiendo el método de Armisén (1993).

Este consistió en poner los geles en tubos de ensayo, posteriormente se colocaron en baño maría a temperatura ambiente, a estos se les agregó una perla de vidrio (0.3 cm de diámetro), la temperatura en el baño maría se incrementó gradualmente y cuando la perla de vidrio cae al fondo se registra como la temperatura de fusión del gel.

Punto de gelificación

Se determinó siguiendo el método de Armisen (1993).

En este se parte del agar en solución dentro de un tubo de ensayo con una esfera de vidrio dentro; el tubo de ensayo se coloca en baño maría a una temperatura igual o mayor de 85 °C. Posteriormente la temperatura se disminuye gradualmente y al momento en que la perla de vidrio se inmoviliza, el gel está formado, se introduce el termómetro y se mide la temperatura registrándose como el punto de gelificación.

Contenido de 3,6 anhidrogalactosa

Se determinó mediante el método colorimétrico de resorcinol-acetal descrito por Yaphe y Arsenault (1965), modificado por Craigie y Leigh (1978), utilizando D-fructosa como estándar y un factor de corrección de 1.087.

Cuantificación de sulfatos

Se determinó mediante el método turbidimétrico con BaCl_2 descrito por Tabatabai (1974), con modificaciones de Craigie y Wen (1984), empleando K_2SO_4 como estándar.

Análisis estadísticos

Dado que el objetivo del presente trabajo fue detectar los valores de condiciones óptimas para extraer agar optimizando el rendimiento y fuerza de gel, las extracciones no se realizaron simultáneamente, por ello cada variable se analizó utilizando un ANOVA de una vía.

Para determinar las diferencias de los parámetros de rendimiento, fuerza de gel y tiempos de pretratamiento alcalino, se realizaron pruebas de homocedasticidad de varianzas y normalidad utilizando la prueba de Cochran. Una vez probada lo anterior, a los datos se les aplicó un ANOVA, utilizando un nivel de significancia de 95 % ($\alpha = 0.05$).

Cuando se detectaron diferencias significativas entre tratamientos se aplicó una prueba *a posteriori* utilizando una DVS (*diferencia verdaderamente significativa*) de Tukey (Wayne, 1983) con modificaciones hechas por Spjøtvoll y Stoline (1973) para tamaños de muestras diferentes. Esta prueba solo se aplicó al tratamiento óptimo encontrado, utilizando la siguiente fórmula:

- Para muestras de igual tamaño:

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\dot{C}M_{\text{residual}}}{n}}$$

- Para muestras con diferente tamaño:

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\dot{C}M_{\text{residual}}}{n_j}}$$

Donde α es el nivel de significancia elegido, k es el número de medias en el experimento, N es el total de observaciones en el experimento, n es el número

de observaciones en un tratamiento, CM es el error o el cuadrado medio dentro de los grupos de la tabla ANOVA, q se obtiene de la tabla H del apéndice I con α , k y $N-k$, y n_j es el más pequeño de los tamaños de muestra asociados cuyas medias se van a comparar.

RESULTADOS

Agar nativo:

El rendimiento promedio obtenido para el agar nativo fue de 25.8 %. Los geles producidos por el agar nativo fueron muy débiles y no dieron suficiente fuerza para realizar en ellos las mediciones, por lo que se consideraron con una fuerza de gel menor a 100 g cm^{-2} .

Agar con tratamiento alcalino:

a) **Concentración variable de NaOH y temperatura a tiempo constante.**

a.1.- Rendimiento:

El máximo rendimiento en base seca de 20.3 % correspondió al tratamiento con NaOH al 2.5 % y 80 °C; el mínimo fue de 17.8 % al utilizar NaOH al 3.0 % y 100 °C (Fig. 5).

Se encontró diferencia significativa entre cada concentración. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre temperaturas (Tabla II).

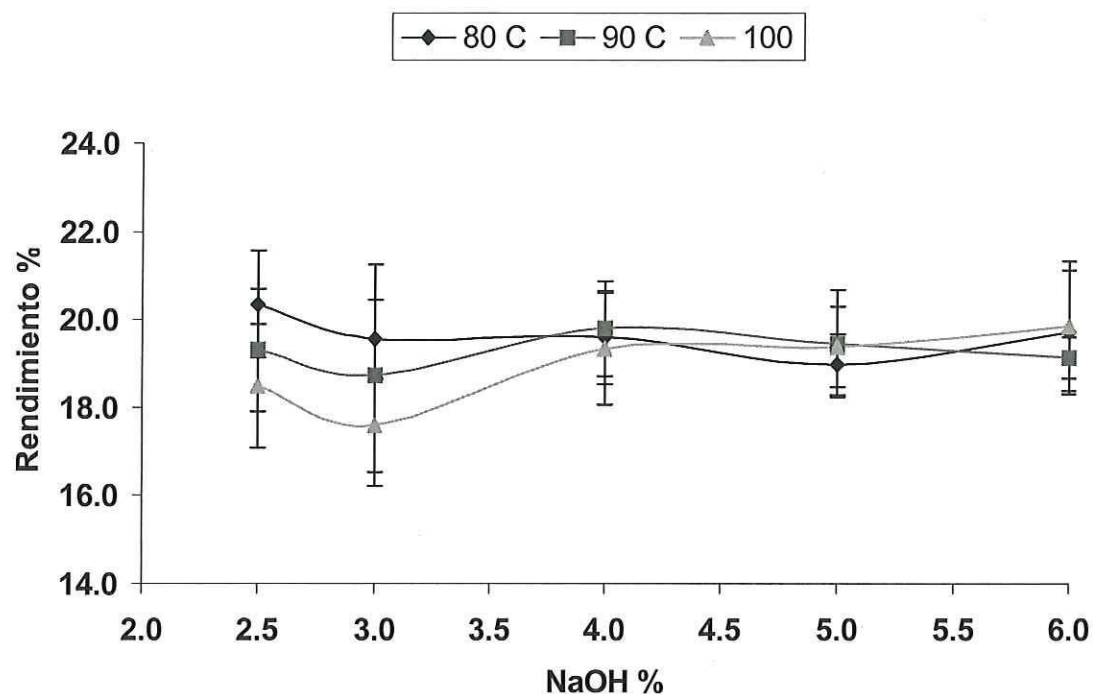


Figura 5.- Rendimientos al utilizar diferentes concentraciones de NaOH, temperaturas y tiempo (60 minutos) constante (N=3; $\pm$ =e.s.).

Tabla II. Análisis ANOVA para rendimiento.

NaOH	SS	DF	MS	F cal.	F crit.	p	CONCLUSIÓN Ho.
2.5	21.6223	2	10.8112	8.8096	0.0515	0.0075	*
3	36.1079	2	18.0540	7.1376	0.0515	0.0139	*
4	7.2162	2	3.6081	3.3765	0.0515	0.0805	*
5	6.3580	2	3.1790	3.8512	0.0515	0.0618	*
6	10.9200	2	5.4600	7.0282	4.2564	0.0145	*
80°]	3.8013	4	0.9505	0.7952	3.0555	0.5464	NS
90° y toda [NaOH]	3.1007	4	0.7759	0.4274	3.0555	0.7865	NS
100° y toda [NaOH]	9.5784	4	2.3946	2.8246	3.0555	0.0626	NS

a.2.- Fuerza de gel:

La máxima fuerza de gel de 1848.0 g cm⁻² (1071.3 g cm⁻² *), correspondió al tratamiento con NaOH al 5.0 % y 90 °C. La mínima de 191.5 g cm⁻² (111 g cm⁻² *) fue para el tratamiento con NaOH al 2.5 % y 80 °C (Fig. 6). Las mediciones de la fuerza de gel en el gelómetro Nikán para los tratamientos de 80, 90 y 100 °C, fluctuaron entre 100 y 1071.5 g cm⁻² con NaOH al 2.5 % y 80 °C, y NaOH al 5.0 % y 90 °C respectivamente (Fig. 7). No se detectaron diferencias significativas las concentraciones de NaOH independientemente de la temperatura usada (Tabla III).

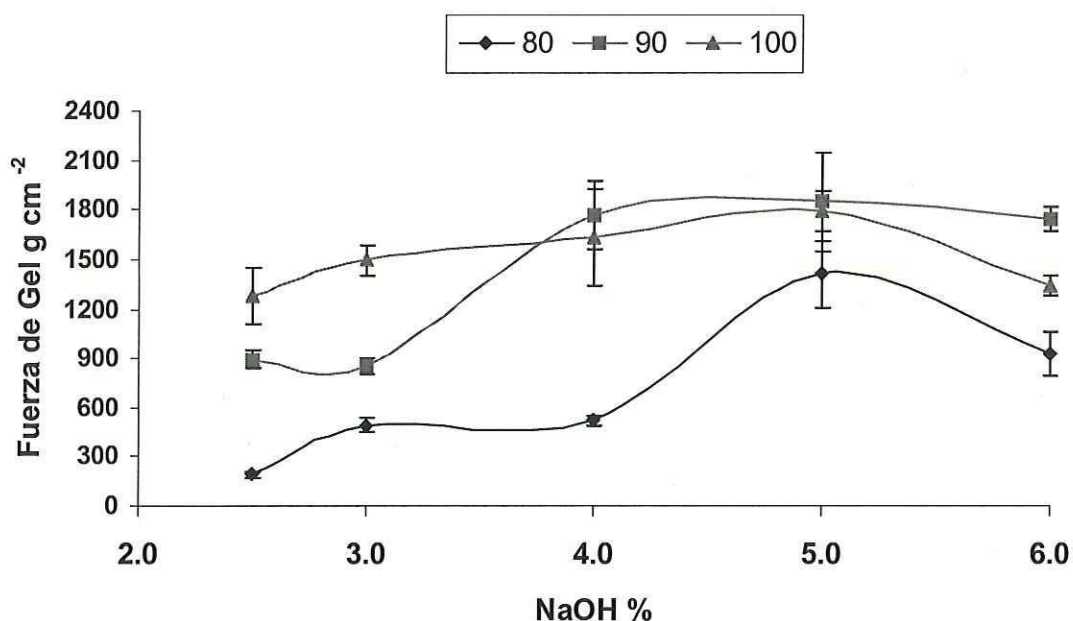


Figura 6.- Fuerzas de gel en g cm⁻² (Miller y Furneaux, 1987) a diferentes tratamientos de NaOH y tres temperaturas (n=8; ±=E.S.).

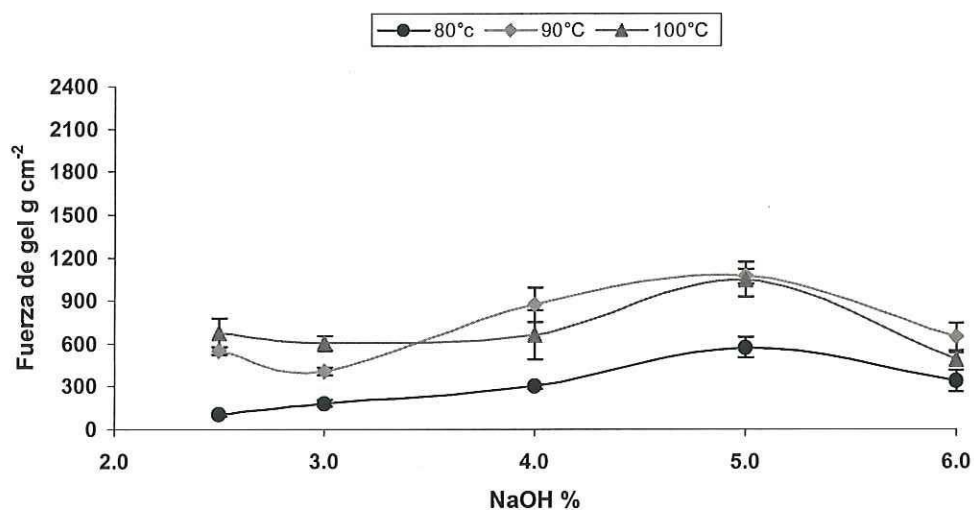


Figura 7.- Fuerzas de gel en unidades Nikán ($n=8$; $\pm=E.S.$).

Tabla III. Análisis ANOVA para fuerza de gel.

	SS	DF	MS	$F_{cal.}$	$F_{crit.}$	P	CONCLUSIÓN HO.
2.5 %	4329189	2	2164594	209.1378	3.5218	1.15E-13	*
3 %	4024932	2	2012466	483.0313	3.4928	1.18E-17	*
4 %	5793617	2	2896808	63.0695	3.5218	4.09E-09	*
5 %	784579	2	392289	9.8766	3.5915	0.0014	*
6 %.	2481486	2	1240743	168.9397	3.4667	1.14E-13	*
80 °C	5600765	4	1400191	125.0181	2.7277	5.23E-17	*
90 °C	7577825	4	1894456	85.3067	2.6414	1.51E-17	*
100 °C	1455585	4	363896	14.3599	2.6335	4.22E-07	*

* Estos valores corresponden a unidades Nikán.

b) Condiciones óptimas de concentración de NaOH y temperatura a tiempo variable:

b.1.- Rendimiento:

En general, el rendimiento disminuyó conforme se incrementó el tiempo de tratamiento alcalino. El rendimiento máximo de 24.4 %, correspondió a NaOH al 5.0 %, temperatura de 90 °C y 15 minutos de tratamiento. El rendimiento mínimo de 15.5 % correspondió a NaOH al 5.0 %, temperatura de 100°C y 120 minutos de tratamiento (Fig. 8).

Se encontraron diferencias significativas entre todos los tratamientos y los tiempos (Tabla IV).

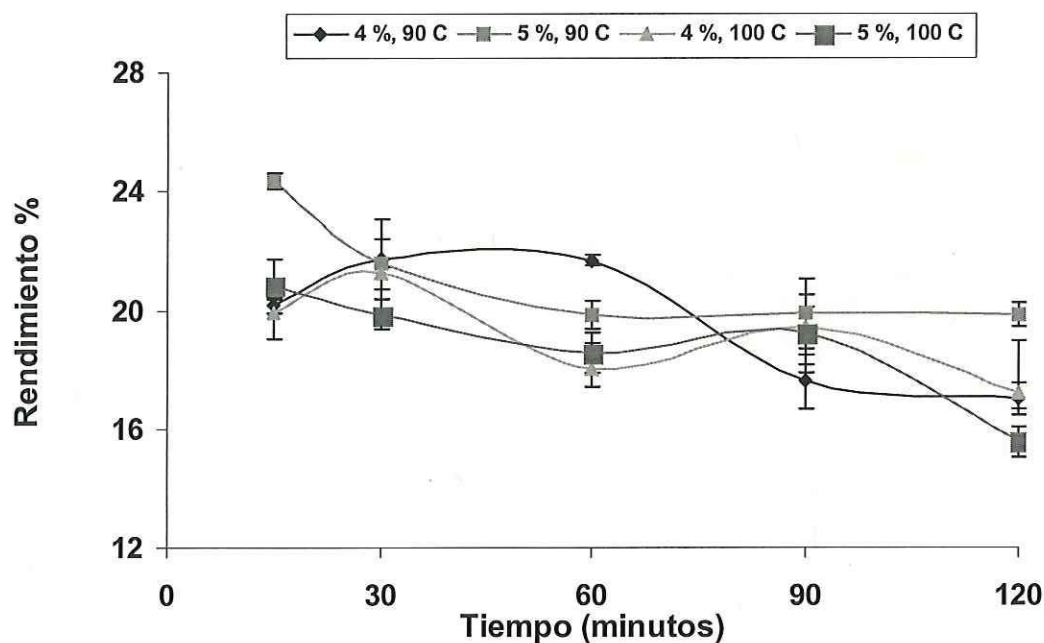


Figura 8.- Rendimiento de agar a distintos tiempos y concentración a temperaturas óptimas. (n=3; $\pm$ =E.S.)

Tabla IV.- Análisis de ANOVA para el rendimiento de las condiciones óptimas.

	SS	DF	MS	F _{cal.}	F _{crit}	p	CONCLUSIÓN HO
4 %, 90 °C	49.76357	4	12.4409	24.9854	3.4780	3.45E-05	*
5 %, 90 °C	37.85735	4	9.4643	6.6705	3.4780	0.0069	*
4%, 100 °C	59.68802	4	14.9220	24.9838	3.4780	3.45E-05	*
5%, 100 °C	44.6417	4	11.1604	18.3830	3.6331	0.0002	*
15 min.	56.3452	3	18.7817	29.4111	4.0661	0.0001	*
30 min.	7.2815	3	2.4271	1.81586	4.0661	0.2222	NS
60 min.	15.9384	3	5.3128	31.2962	4.0661	9.05E-05	*
90 min.	22.6797	3	7.5599	7.1683	4.0661	0.0117	*
120 min.	22.4118	3	7.4706	10.4436	4.3468	0.0056	*

b.2.- Fuerza de gel:

La fuerza de gel se incrementó conforme se incrementó el tiempo de tratamiento alcalino, hasta llegar a la máxima fuerza de gel a los 90 minutos, a partir de ese tiempo, la fuerza de gel cayó levemente (Fig. 9, 10). La máxima fuerza de gel con ambos tratamientos (Miller y Furneaux, 1987 y Nikán) fue de 1646 g cm^{-2} (954.2 g cm^{-2} *) que correspondió a NaOH a 5.0 %, temperatura de 100 °C y 90 minutos de tratamiento alcalino. La mínima de 270 g cm^{-2} (156.5 g cm^{-2} *) a NaOH al 5.0 %, temperatura de 90 °C y 15 minutos de tratamiento (Fig. 9, 10). Se detectaron diferencias significativas entre tratamientos óptimos (Tabla V). La prueba *a posteriori* de Tukey, aplicado al óptimo no mostró diferencias significativas entre tiempos (15=30=60=90=120) (Tabla VI.)

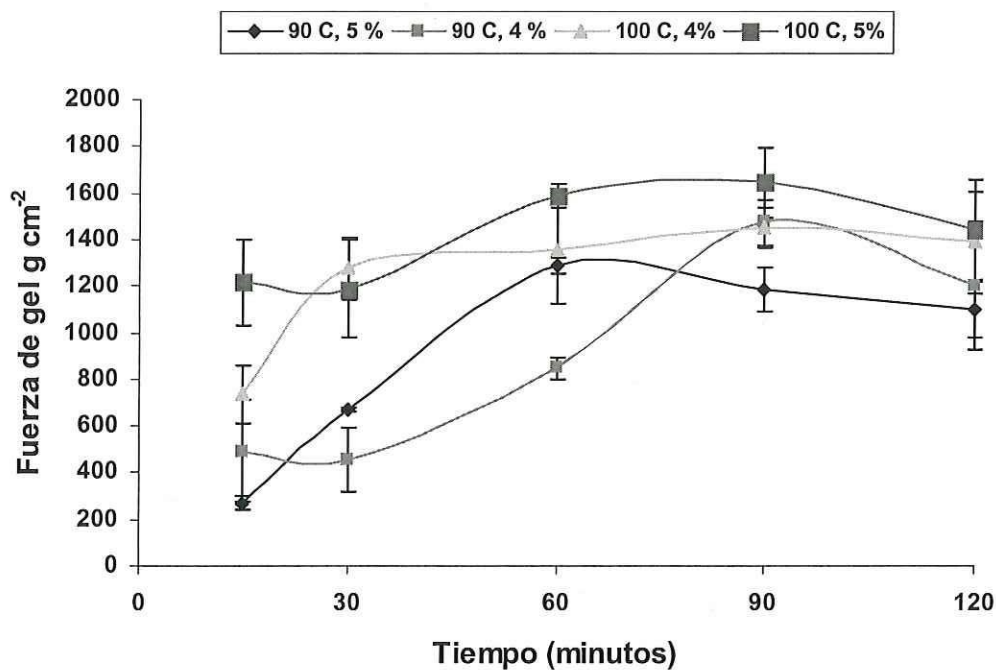


Figura 9.- Fuerza de gel de condiciones óptimas variando el tiempo tratamiento.

(n=6; $\pm$ =E.S.)

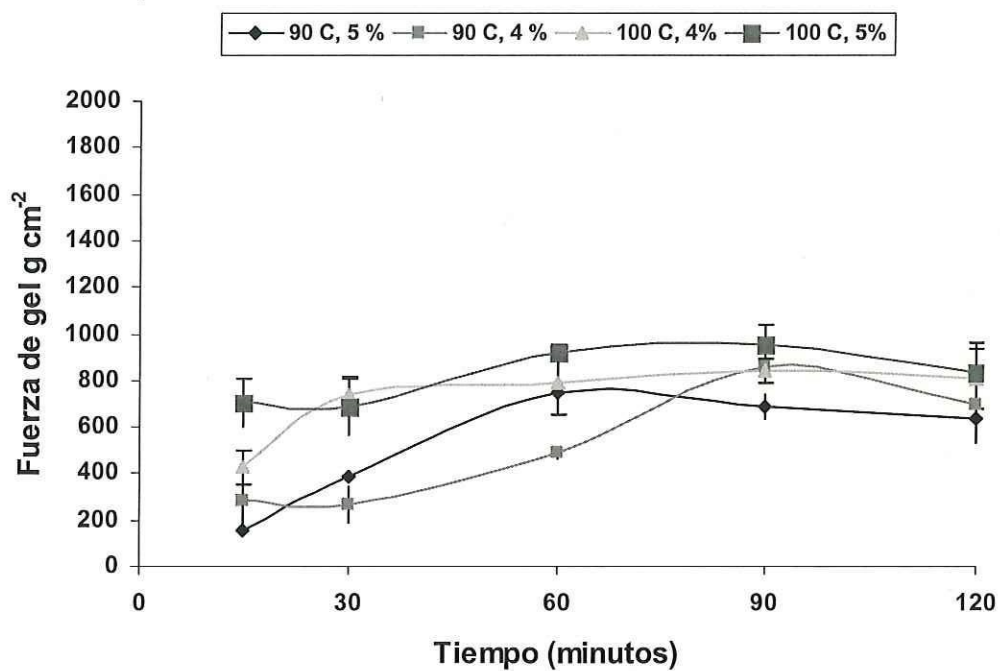


Figura 10.- Fuerza de gel de condiciones óptimas (Nikán) variando el tiempo tratamiento. (n=6; $\pm$ =E.S.)

Tabla V. ANOVA para fuerza de gel y tratamiento óptimo a distintos tiempos.

	SS	DF	MS	F _{cal.}	F _{crit.}	p	CONCLUSIÓN H ₀ .
90°C y 4% NaOH	4319268	4	1079817	33.9062	2.7955	2.4E-09	*
90°C y 5% NaOH	3332993	4	83324	156.9066	2.9277	9.9E-14	*
100°C y 4% NaOH	2281693	4	570423	23.9011	2.7955	6.6E-08	*
100°C y 5% NaOH	1004442	4	251110	8.6030	2.7762	0.0001	*
15 min.	2601984	3	867328	32.3565	3.1599	1.8E-07	*
30 min.	2202391	3	734130	33.9284	3.2873	6.3E-07	*
60 min.	1867946	3	622648	59.8481	3.0983	3.6E-10	*
90 min.	250837.8	3	83612	7.0133	3.2873	0.0035	*
120 min.	533561.9	3	177854	4.0259	3.0983	0.0215	*

Tabla VI. Prueba de Tukey para el tratamiento óptimo (5 % y 100 °C).

Q, 95%, K, N-K	MS	N	DVS	RESULTADO	DECISIÓN	MIN.
4.14	251110.5	5	927.786	-896.715	NS	15-30
		6	846.9489	-475.266	NS	15-60
		6	846.9489	-416.592	NS	15-90
		6	846.9489	-444.195	NS	15-120
		5	927.786	-466.359	NS	30-60
		5	927.786	-869.113	NS	30-90
		5	927.786	-298.706	NS	30-120
		6	846.9489	-570.077	NS	60-90
		6	846.9489	-846.949	NS	60-120
		6	846.9489	-846.949	NS	90-120

El mejor tratamiento para *G. lemaneiformis* corresponde a NaOH al 5%, temperatura de 100 °C y 90 minutos de tratamiento alcalino (Fig. 9, 10).

Contenido de 3,6-anhidrogalactosa

El agar nativo *G. lemaneiformis* presentó un contenido de 3,6-AG de aproximadamente 27.0 %. El tratamiento alcalino, incrementó notablemente el contenido de 3,6 anhidrogalactosa. Un máximo de 40.2 % se obtuvo con las condiciones óptimas de tratamiento alcalino (NaOH al 5 %, 100 °C y 90 min.); el menor contenido para el agar con tratamiento alcalino (37.2 %) correspondió a las mismas condiciones NaOH al 5 %, 100 °C pero en 120 minutos de tratamiento (Fig.11).

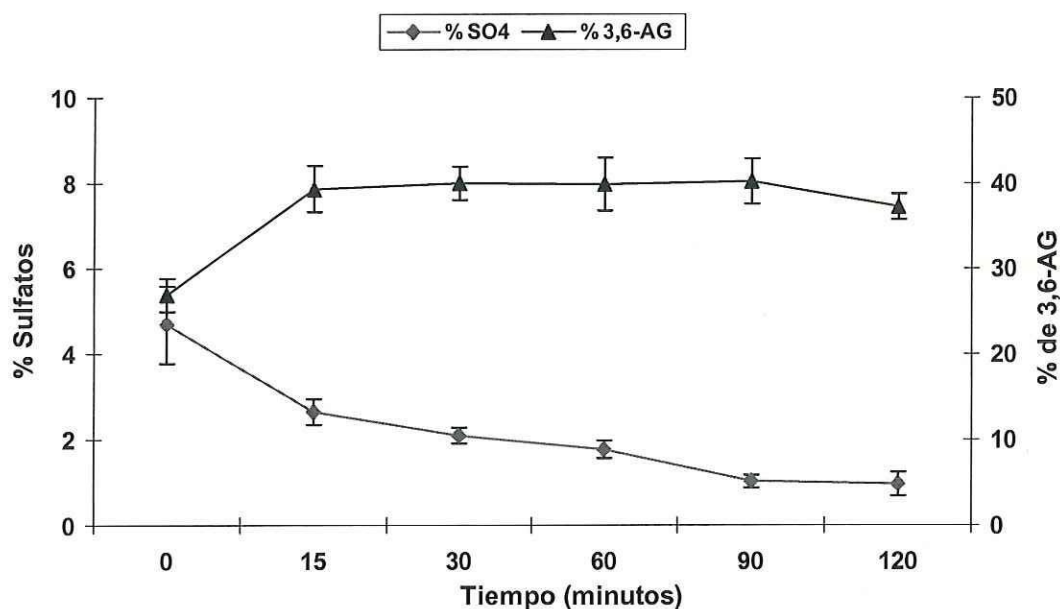


Figura 11.- Contenido de sulfatos y 3,6-anhidrogalactosa con NaOH al 5 % y 100 °C a distintos tiempos de tratamiento alcalino.

Respecto al contenido de 3,6 AG no se encontraron diferencias significativas entre tiempos (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis de ANOVA para el contenido de 3,6 AG y sulfatos.

	SS	DF	MS	F _{CAL.}	F _{CRIT.}	p	CONCLUSIÓN HO.
3,6 anhidrogalactosa	51.3236	4	12.8309	2.1263	2.6260	0.096981	NS
Sulfatos con nativo	67.0918	5	13.4182	99.1562	2.4771	5.13E-20	*
Sulfatos sin nativo	15.4641	4	3.8660	76.0122	2.6684	7.07E-16	*

El análisis de correlación de Pearson mostró una fuerte correlación inversa de 3,6 AG y sulfatos con una r crítica de -0.811 contra la r calculada de -0.8311.

También se detectó correlación positiva entre la 3,6 AG y fuerza de gel (Tabla VIII).

Tabla VIII.- Coeficientes de correlación de Pearson 3,6 AG, sulfatos y fuerza de gel.

COMPARACIÓN	n	Rcal.	Rcrit.	CONCLUSIÓN
AG vs. sulfatos	6	-0.831	-0.811	Inversamente proporcional significativa
AG vs. F. de gel	5	0.804	0.878	Directamente proporcional significativa
Sulfatos vs. F. de gel	5	-0.736	-0.878	Inversamente proporcional significativa

Contenido de sulfatos

El contenido de grupos sulfato en el agar nativo de *G. lemaneiformis* en promedio fue de 5.1 %. Los agares con tratamiento alcalino tuvieron un valor máximo de 2.6 % a 15 minutos de tratamiento, el cual disminuyó gradualmente hasta ≈ 1 % a 120 min. (Fig. 10).

Se encontraron diferencias significativas en el contenido de sulfatos a diferentes tiempos de tratamiento alcalino (Tabla VIII).

El análisis de Pearson mostró que existe una correlación inversa entre el contenido de sulfatos vs. fuerza de gel (Tabla IX).

Punto de fusión y de gelificación

Los puntos de fusión y gelificación se determinaron solo para los agares extraídos con las condiciones óptimas de tratamiento alcalino. La temperatura de fusión fluctuó entre 80.6 °C a 93.7 °C, presentándose el máximo valor a los 60 minutos de tratamiento alcalino y el mínimo a los 120 min (Tabla IX).

La máxima temperatura de gelificación de 36 °C se presentó a 90 minutos, la menor de 32.2 °C a 120 minutos (Tabla IX).

El gel con mayor intervalo de histéresis correspondió a 60 minutos de tratamiento alcalino (Tabla IX).

Tabla IX. Punto de fusión, gelificación e histéresis en °C.

	15'	30'	60'	90'	120'
P. de fusión	91.3	92.3	93.7	93.6	80.6
P. gelificación	33.6	35	34.2	36	32.2
Histéresis	57.7	57.3	59.5	57.6	48.4

DISCUSIONES

Agares obtenidos de especies de *Gelidium* y *Pterocladia*, poseen un bajo contenido de sulfatos y gelifican sin necesidad de un tratamiento alcalino, por lo que pueden ser empleados directamente en diferentes aplicaciones comerciales a diferencia del agar nativo de *G. lemaneiformis*, que carece de capacidad gelificante. En general el agar obtenido de especies *Gracilariales* producen geles débiles considerados como "agaroides", tales como *Gracilaria confervoides* (L.) Grev. (Moore, 1944), *G. lemaneiformis* de Carolina del Norte (USA) (Bird y Hinson, 1992) y *G. euchemoides* Harvey (Villanueva *et al.*, 1999) entre otras. No obstante, mediante la aplicación de un tratamiento alcalino, se pueden mejorar las propiedades de estos agares y sean aptos para usos comerciales.

La utilización de un tratamiento alcalino ha demostrado efectos positivos en la calidad del agar, debido a la eliminación de impurezas y de grupos sulfatos. El tratamiento alcalino elimina los grupos sulfato lábiles convirtiendo la α -L-galactosa-6-sulfato a 3,6 anhidro- α -L-galactosa (Craigie y Wen, 1984, Rees, 1972; Yaphe y Duckworth, 1972), esto tiene como consecuencia un incremento en la calidad del agar al cambiar sus características físico-químicas.

A pesar de lo anterior, tiene efectos contrarios como son una disminución en el rendimiento y fuerza de gel cuando se aplican altas concentraciones de álcali, temperaturas y tiempos de tratamiento prolongados debido a la depolimerización de la cadena del agar, la cual se reduce al emplear

condiciones controladas entre ellas, el calentamiento previo del álcali antes de agregar el alga (Myslabodski, 1990).

La aplicación de un tratamiento alcalino a especies de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* (variando concentraciones de NaOH, temperatura y tiempo de tratamiento alcalino) producen cambios notables en el rendimiento y las características del agar (Villanueva *et al.*, 1999; Bird y Hinson 1992; Murano *et al.*, 1990; Durairatnam 1987; Hong *et al.*, 1969).

En general agares obtenidos con tratamiento alcalino muestran un menor rendimiento comparado con su agar nativo, debido principalmente a la disolución de fracciones de bajo peso molecular durante el tratamiento (Freile-Pelegrín y Robledo, 1997).

El rendimiento obtenido para *G. lemaneiformis* a cualquier concentración y temperatura probada en este estudio, cumple con las características de rendimiento recomendados industrialmente ($> 8.0 \%$) (Armisen, 1995).

Todos los parámetros considerados (concentración de NaOH, temperatura y tiempo de tratamiento) tienen un efecto marcado en la fuerza de gel tal como lo demuestra Villanueva *et al.*, (1997) en los agares de *G. euchemoides* y Freile-Pelegrín y Robledo (1997) en el agar de *G. cornea*.

La variación de concentración de NaOH y temperaturas a tiempo constante de tratamiento alcalino (60 minutos) mostró variación en el rendimiento a concentraciones de NaOH menores de 4.0 %, a todas las temperaturas probadas, a partir de NaOH al 4.0 % el rendimiento muestra variaciones mínimas a cualquier temperatura y concentración de álcali debido

posiblemente a la fuerza iónica de la solución, producida por la concentración de NaOH empleada.

El rendimiento en las condiciones óptimas (variando el tiempo), disminuye conforme se incrementa el tiempo del tratamiento alcalino, esto se puede atribuir a la disolución del agar motivado por la degradación del polímero por efecto del álcali, temperatura y tiempo de tratamiento (Brasch *et al.*, 1983; Myslabodski, 1990).

Un rendimiento mínimo de 15.5 % se obtuvo con NaOH al 5.0 %, 100 °C, y 120 minutos de tratamiento alcalino y un máximo de 24.4 % correspondió a NaOH al 5.0 %, 90 °C por 15 minutos, este rango es superior a los reportados para la misma especie 9.9-23.7 % por Bird y Hinson (1992) y de 8.2-15.4 % por Arellano-Carbajal *et al.*, (1999) y el máximo rendimiento encontrado es mayor al reportado para especies como *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan) (22.2%), (Bird y Hinson, 1992), *Gracilaria maramae* (South) (14%), *Gracilaria arcuata* (Zanardini) v. *Snackeyi* (20%) (Falshaw *et al.*, 1999) y menor que *G. blodgettii* (Gmlein) Silva (25.7%) (Bird y Hinson, 1992) *G. cornea* (31.6 %) (Freile-Pelegrín y Robledo, 1997b).

En general el parámetro de calidad más importante del agar es la fuerza de gel (Onraet y Robertson, 1987) ya que de acuerdo a ella serán las aplicaciones a las que pueda destinarse, ej.; las aplicaciones bacteriológicas y biomédicas requieren fuerzas de gel entre 500 a >700 g cm⁻² y las alimenticias requieren fuerzas de 150 a 600 g cm⁻² (www.seatechagar.com).

La fuerza de gel de los agares nativos, fueron tan débiles que no soportaron el peso del émbolo ($<100 \text{ g cm}^{-2}$), estos agares son similares a los encontrados por Craigie y Wen (1984) para *Gracilaria tikvahiae* (Harvey) de $8\text{--}32 \text{ g cm}^{-2}$, Freile-Pelegrín (1997b) de 89 g cm^{-2} en *G. cornea* y los geles de *G. lemaneiformis* de Carolina del Norte para los meses de marzo y junio que no gelificaron (Bird y Hinson, 1992), sin embargo en estos últimos, la fuerza de gel se incremento de 0 a aproximadamente 1300 g cm^{-2} al tratar el alga con NaOH al 4.0 %.

Al variar el tiempo en las condiciones óptimas encontradas se observa un incremento gradual en la fuerza de gel hasta los 90 minutos de tratamiento, posterior a este tiempo disminuye, lo que sugiere una degradación de la molécula (Nishinari y Watase, 1983). El valor máximo de fuerza de gel encontrado en las condiciones óptimas es menor a las encontradas en el primer experimento, es posible que el uso de la autoclave al disolver el agar afecte el polímero de alguna forma disminuyendo su fuerza de gel (Llamas, com. Per. *).

A pesar de la disminución en la fuerza de gel entre los experimentos en que se disolvió el agar a reflujo y los que se disolvieron en autoclave 1847 g cm^{-2} (1071 g cm^{-2} *), son superiores a los encontrados para la misma especie de 892 g cm^{-2} reportados por Arellano-Carbajal *et al.*, (1999), pero menores a los reportados por Bird y Hinson (1992) de 1300 g cm^{-2} debido posiblemente a las diferencias en los métodos de extracción empleados.

El análisis estadístico no mostró diferencias para la fuerza de gel en las condiciones óptimas probadas (NaOH al 4.0 y 5.0 %, temperaturas de 90 y 100

°C), pero se observa que la mayor fuerza de gel corresponde a NaOH al 5.0 %, temperatura de 100 °C y 90 minutos de tratamiento, considerándose esta como las condiciones óptimas de tratamiento alcalino para *G. lemaneiformis*.

En un trabajo en proceso realizado para la empresa AMARES, S.A., empleando las condiciones óptimas establecidas en este estudio, se obtuvieron fuerzas de gel superiores a los 2400 g cm⁻² (1391 g cm⁻²*)

El máximo contenido de 3,6-AG (40.2 %) en *G. lemaneiformis* coincide con la mayor fuerza de gel encontrada, es ligeramente mayor a los valores encontrados para agar con tratamiento alcalino de la misma especie por Bird y Hinson (1992) pero menor al reportado por Arellano-Carbajal *et al.*, (1999) de (47.8 %).

El contenido de sulfatos (1.03 %) para las condiciones óptimas es menor a los encontrados por Bird y Hinson (1992) pero ligeramente mayor al valor reportado por Arellano-Carbajal *et al.*, (1999) (0.8 %).

El punto de gelificación (32.2–36 °C) y el de fusión (93.7 °C) encontrados en este estudio son menores al intervalo reportado para la misma especie por Arellano-Carbajal (1999) temperatura de gelificación (34.3-37 °C) y fusión (92-98 °C); sin embargo, caen dentro de las especificaciones para agar comercial (temperatura de gelificación no mayor a 38 °C y fusión no menor a 90 °C, Armisén y Galatas, 1987). Las diferencias encontradas en el punto de gelificación y fusión se deben al efecto del tratamiento alcalino (Freile-Pelegrín y

* Llamas, C. Empresa AgarMex

* Estos valores corresponden a unidades Nikán.

Robledo, 1997), por la época del año (Arellano-Carbajal *et al.*, 1999) así como por el peso molecular del polímero (Selby y Wynne, 1973).

La información generada en este estudio, es sin duda benéfica para la industrialización de agar de *G. lemaneiformis*.

Las condiciones óptimas encontradas en este estudio pueden variar para cada especie debido a las posibles variaciones en la composición del agar nativo de cada una en particular.

Se recomienda hacer este tipo de estudio para las diferentes agarofitas de importancia comercial.

CONCLUSIONES

- El agar nativo de *Gracilariopsis lemaneiformis* no gelifica, por lo que no es apto para usos comerciales.
- El tratamiento alcalino genera una disminución en el rendimiento respecto al agar nativo.
- El uso de un tratamiento alcalino previo a la extracción de agar, disminuye el contenido de sulfatos e incrementa el contenido de 3,6-anhidrogalaactosa y la fuerza de gel.
- Las condiciones óptimas para la extracción de agar de *G. lemaneiformis* son NaOH al 5.0 %, 100 °C a 90 minutos de tratamiento.
- El empleo de la autoclave en la disolución del agar afecta adversamente la fuerza de gel.
- Las propiedades reológicas del agar obtenido con las condiciones óptimas caen dentro de las especificaciones de agar comercial.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Borrego, S., Rivera, J.A., Gaxiola-Castro, G., Acosta-Ruíz, M.J. & Schwartzlose, R.A. (1978). Nutrientes en el Golfo de California. *Ciencias Marinas*, **5**: 53-71.
- Amador-Buenrostro, A., Serrano-Guzmán, S.J. y Argote-Espinoza, M.L. (1991). Modelado numérico de la circulación inducida por el viento en Bahía de los Ángeles, B.C., México. *Ciencias Marinas* **17**: 39-57.
- Araki, C. (1944). Chemical studies on agar-agar. XIII. Separation of agarobiose from the agar-agar like substance of *Gelidium amansii* by partial hydrolysis. *J. Chem. Soc. Japan*, **65**: 533-8.
- Araki, C. (1966). Some recent studies on the polysaccharides of agarophytes. In Young EG, McLahlan, JL (eds). *Proceedings of the Fifth Intl. Seaweed Symp.*, Pergamon Press, Oxford, 3-17.
- Arellano-Carbajal, F., Pacheco-Ruíz, I & Correa-Díaz, F. (1999). Seasonal variation in agar yield and quality of *gracilariopsis lemaneiformis* (BORY) Dawson, Acleto et Foldvik, from the Gulf of California, México, *Ciencias Marinas* **25**:51-62.
- Armisen, R. (1993). Course 4. In Master, Degree Course in Applied Algology. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España. Tomo III: 45-62.
- Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of *Gracilaria*. *J. of Applied Phycology*. **7**: 231-243.

- Armisen , R. & Galatas, F. (1987). Production, properties and uses of agar. In McHugh DJ (ed). Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fish. Tech. Pap. 288, Rome: 1-57.
- Arnott, S., A. Fulmer, W. E. Scott, I.C.M. Dea, R. Moorhouse y D.A. Rees. (1974). The agarose double helix and its function in agarose gel structure. J. Mol. Biol., **90**:269-284
- Becerril-Bobadilla, F.J.U. (2001). Efecto de El Niño 1997-1998 en los mantos de *Ulva lactuca* (L.) en la costa noroeste del golfo de California. Tesis de Maestría. FCM, UABC. Ensenada. B.C. 75 pp.
- Bird, K.T. (1988). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. Strain G-16: effects of environmental factors. Bot. Mar. 31:33-39
- Bird, K.T. & Hinson, T.K. (1992). Seasonal variations in agar yields and quality from North Carolina Agarophytes. Bot. Mar. **35(4)**: 291-295.
- Brasch, D.J, Chuauh, C.T. and Melton, D.L. (1982) The agar type Polysaccharide from the Red Alga *Gracilaria secundata*. p 190-199. University of Otago, Dunedin, New Zeland.
- Bray, N.A, & Robles, J.M. (1991). Physical oceanography of the Gulf of California. In: J.P. Dauphin and B.R.T. Simoneit (eds). The Gulf and Peninsular Province of the California. Tulsa, Okla.: Am. Assoc. Petrol. Geol. 834 pp.
- Castro-Montoya, H., Segovia-Zavala, J.S. & Delgadillo-Hinojosa, F. (1987). Resultados preliminares de nutrientes en la parte Norte de Bahía

de los Angeles, B.C., (verano 1986). Resúmenes: VII Congreso Nacional de Oceanografía, Ensenada 120pp.

- Cote, G.L. & Hanisak, H.D. (1986). Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. Bot. Mar., **29**:359-366.
- Craigie, J.S. (1990). Cell walls. In Cole K.M. Sheath R.G. (eds), Biology of the Red Algae, Cambridge University Press, Cambridge, 221-257.
- Craigie, J.S. & Leigh, C. (1978). Carrageenans and agars. In (J.A. Hellebust and J.S. Craigie, eds). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press. Cambridge. Pp 109-131.
- Craigie, J. S. y Wen, Z. C. (1984) Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). Can. J. Bot., **62**:1665-1670.
- Craigie, J.S., Wen, Z.C. & Van Der Meer, J.P. (1984). Interspecific, intraspecific and nutritionally determined variations in the composition of agar from *Gracilaria* sp. Bot. Mar. **27**:55-61.
- Daniel, W.W. (1977). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa, México. 485pp.
- Dawson, E.Y. (1949). Studies in the northeast Pacific Gracilareaceae. Allan Hancock Found. Occ. Pap. **7**:1-104.

- Duckworth, M. & Yaphe, W. (1971). The structure of agar. Part 1. Fractionation of a complex mixture of polysaccharides. *Car. Res.*, **16**:189-197.
- Durairatnam, M. (1987) Studies of the yield, gel strength and quality of agar of *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva from Brazil. *Hydrobiologia*. **151/152**: 509-512.
- Espinoza-Avalos, J. (1993). Macroalgas Marinas del Golfo de California. In Salazar-Vallejo, S.I. & N.E., González (eds). *Biodiversidad Marina y Costera de México*. Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México:328-357.
- Falshaw, r., Furneaux, R H., Pickering, T.D. y Stevenson, D.E. (1999). Agar from Three Fijian *Gracilaria* Species. *Bot. Mar.* 42 (1) pp 51-59.
- Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. (1997a). Effects of Season on the Agar Content and Chemical Characteristics of *G. cornea* from Yucatán, México. *Bot. Mar.* **40**:285-290.
- Freile-Pelegrín, Y. & Robledo, D. (1997b). Influence of alkali treatment on agar from *Gracilaria cornea* from Yucatán, México. *J. of Applied Phycol.* **9**:533-539.
- Guiseley, k.B. (1987). Natural and synthetic derivatives of agarose and their use in biochemical separations. In Yalpani M (ed),. *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Properties Relations and Applications*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 139-147.
- Hjerten, S. (1962). A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis. *Biochemist. Biophys. Acta* **62**: 445-449.

- Hong, K. C., M.E. Goldstein and W. Yaphe. (1969). A chemical and enzymic analysis of the polysaccharides from *Gracilaria*. Proc. Int. Seaweed Symp. **6**:473-482.
- Indegaard, M. & Ostgarrd, K. (1991). Polysaccharides for food and pharmaceutical uses. In Guiry, M.D., Blunden, G. (eds), Seaweed Resources in Europe – Uses and Potential. Wiley & Sons Ltd., Chichester, England: 169 – 183.
- Kim, D.H., & Enriquez, N.P. (1978). Yields and gel strengths of agar from cystocarpic and tetrasporic plants of *Gracilaria verrucosa* (Florideophycidae). Proc. Intl. Seaweed Symp. **9**: 257-262.
- Kloareg, B. & Quatrano, R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. Oceanog. Mar. Biol. Ann. Rev. **26**:259-315.
- Lahaye, M. & Rochas, C. (1991). Chemical structure and physic-chemical properties of agar. Hydrobiologia, **221**:137-148
- Lewis, J.G., Norman, F.S., Gordon, G.G. (1988). Commercial production and application of algal hydrocolloids. In Lembi CA, Waaland, JR (eds), Algae and Human Affairs. Cambridge University Press, Cambridge: 205-236.
- Lian, P. & Zhang, Q. (2000). Agar properties of several Chinese species of *Gracilaria* as affected by the salinity of seawater and alkali pretreatment. 2000 IFT Annual Meeting. 51D-17.
- Llamas com. Personal.

- Luhan, Ma. R.J. (1992). Agar yield and gel strength of *Gracilaria heteroclada* collected from Iloilo, Central Philippines. Bot. Mar., **35**:169-172.
- Matsunaga, T. Karube, I. And Suzuki, S. (1980). Some observations on immobilized hydrogen producing bacteria: behavior of hydrogen in gel membranes. Biotechnology. Bioen. **22**: 2607-2615.
- McLachlan, J. y Bird, C.J. (1986). *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. Aquatic. Bot., **26**:27-49
- Miller, I.J. & Furneaux, R.H. (1987). Chemical characteristics of the galactans from the forms of *Gracilaria secundata* from New Zeland, Bot. Mar. **30**:427-435.
- Minghou, J. (1990) Processing and extraction of phycocolloids. In FAO/ACA. Technical Resource Papers. Regional Workshop on the Culture and Utilization of Seaweeds. Vol. II (Regional Seafarming Development and Demonstration Project RAS/90/002. 27-31 August 1990. Cebu City, Philippines. Regional Seafarming Development and Demonstration Project/Network of Aquaculture Centres in Asia. Bangkok, Thailand. Pp 85-96.
- Murano, E., Brandolin, C., Zanetti, F. Paoletti, S. Y Rizzo, R. (1990). Characterization of an agar fraction extracted from *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). Hydrobiologia **204/205**: 567-571.

- Murano, E., Toffanin, R., Pedersini, C., Carabot-Cuervo, A., Blunden G. & Rizzo, R. (1996). Structure and properties of agar from two unexploited agarophytes from Venezuela. *Hidrobiología*, **326/237**:497-500.
- Myslabodski, D.E. (1990). Red-Algae galactans: Isolation and recovery procedures-effects on the structure and rheology. Ph.D. Thesis. University of Trondheim, NTH. Norway. 225p.
- Moore, L.B. (1944). New Zealand seaweed for agar manufacture. *N.Z. J. Sci. & Tech.* **25B**:183-209
- Nishinari, K & Watase ,M. (1983). Effect of alkali pretreatment on the rheological properites of concentrated agar-agar gels. *Carbohydr. Polym.* **3**:39-52.
- Norris, J.N. (1975). Marine algae of northern Gulf of California. *Bot. Mar.* **39**:201-206.
- Onraet, A.C. y B.L. Robertson (1987) Seasonal Variation and Properties of Agar from Sporophytic and Gametophytic Phases of *Onikusa pristoides* (Turner) Akatsuka (Gelidiaceae, Rhodophyta). *Bot. Mar.* **30**: 491-495.
- Oza, R.M. (1978). Studies on the Indian *Gracilaria*. IV Seasonal variation in agar and gel strength of *Gracilaria corticata* J. Ag. Occurring on the coas of Veraval. *Bot. Mar.*, **26**:27-49.
- Pacheco-Ruíz, I. (2000). Historia de vida de *Chondracanthus pectinatus* (Gigartinales, Rhodophyta) en la costa noroeste del Golfo de California. Ph. D. Tesis. Universidad Autónoma de Baja California, México, 123.

- Pacheco-Ruíz, I, Zertuche-González, J.A. (1996). The commercially valuable seaweeds of the Gulf of California. *Bot. Mar.* **39**:201-206.
- Pacheco-Ruíz, I, Zertuche-González, J.A y Chee-Barragán, A. (2002). Comercial exploitation of *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta) in the Gulf of California, México. *Proc. Intl. Seaweed Symp.* **17**: (En prensa).
- Rebello, J., Ohno, M., Critchley, A.T. and Sawamura, M. (1996). Growth rates and agar quality of *Gracilaria gracilis* (Stakchouse) Steentoft from Namibia, southern Africa. *Bot. Mar.*, **39**:273-279.
- Rees, D.A. (1961). Enzymic desulphation of porphyran. *Biochem. J.* **80**: 449-453.
- Rees, D.A. (1969). Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **24**:267-332.
- Rees, D.A. (1972). Shapely polysaccharides. *Biochem. J.* **126**:257-273.
- Renn, D.W. (1984). Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *I & EC Product Research and Development* **23**: 17-21
- Renn, D.W. (1990). Seaweeds and biotechnology – inseparable companions. In Linstrom SC, Garielson PW (eds). Thirteenth International Seaweed Symposium. *Developments in Hydrobiology* 58. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 7-13. Reprinted from *Hydrobiology* 204/205.
- Roden, G.I. & Groves, G.W. (1959). Recent oceanographic investigations in the Gulf of California. *J. Mar. Res.* **18**:10-35

- Santos, G.A. & Doty, M.S. (1983). Agarose from *Gracilaria cylindrica*. Bot. Mar. **26**: 31-34
- Setchell, W.A. & Gardner, N.L. (1924). The marine algae. Expedition of the California Academy of Sciences to the Gulf of California.
- Smith, Karl J. (1988). Calculus with applications. Brooks/Cole Publishing Company, Inc. Belmont, California, USA. 515pp.
- Tabatabai, M.A. (1974). Determination of sulfates in water samples. Sulphur. Inst. J. **10**:11-13.
- Tsuchiya, Y. & Hong, K. (1966). Agarosa and agaropectina in *Gelidium* sp. and *Gracilaria* sp. Agar. In : Proc. Intl. Seaweed Symp. **5**:315-321.
- Villanueva, R.D., Pagba, C.V. & Montaña, N.E. (1997). Optimized Agar Extraction from *Gracilaria eucheumoides* Harvey. Bot. Mar. **40**:369-372.
- Villanueva, R.D., Montaña, N.E., Romero, J.B., A.K.A. y Enríquez, E.P. (1999). Seasonal variations in the yield, gelling properties and chemical composition of agars from *Gracilaria eucheumoides* and *Gelidiella acerosa* (Rhodophyta) from the Philippines. Bot. Mar. **42**(2): 175-182.
- Wayne, W. Daniel. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 5ª. Edición. UTEHA. NORIEGA EDITORES. México.
- Womer, M.C. (1982). The Agarose Monograph. Marine Colloids Division, FMC Corporation, Rockland, ME., part 3, 16-22.
- Wong, K.F. & Craigie, J.S. (1978). Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae). Plant Physiol. **61**: 663-666.

- www.seatechagar.com
- Yang, S.S., & Wang, C.Y. (1983). Effect of environmental factors on *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta) in Shantou District Guandong, PROC: Bot. Mar., **27**:265-268.
- Yaphe, W. & Arsenault, G.P. (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. *Analyt. Biochem.* **13**:143-148.
- Yaphe, W. & Duckworth, M. (1972). The relationship between structures and biological properties of agars. *Proc. Int. Seaweed Symp.* 7:15-22.
- Zertuche-González, J.A. (1988). In situ life history, growth and carrageenan characteristics of *Eucheuma uncinatum* (Setchell & Gardner) Dawson from the Gulf of California. Ph.D. dissertation, State University of New York at Stony Brook.
- Zertuche-González, J.A.(1994). Situación actual de la industria de las algas marinas productoras de ficocoloides en México. In Zertuche-González, J.A. (ed). Situación Actual de la Industria de las Algas Marinas Productoras de Ficocoloides en América Latina y el Caribe. FAO. México:33-37.