

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**



**“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA COMPOSICIÓN DEL ALGA  
VERDE *Ulva clathrata* EN CONDICIONES DE CULTIVO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
OCEANÓLOGO**

Presenta:

**RAMÓN MEZA SORIA**

**Ensenada, Baja California, México.**

**Agosto, 2008.**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**“EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA COMPOSICIÓN DEL ALGA  
VERDE *Ulva clathrata* EN CONDICIONES DE CULTIVO”**

**TESIS PROFESIONAL**

Que presenta:

**RAMÓN MEZA SORIA**

APROBADO POR:

---

M. C. ENRIQUE HERNANDEZ GARIBAY

---

DR. ISAÍ PACHECO RUÍZ

---

M.C. JUAN MANUEL LÓPEZ VIVAS

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que sin ellos mi vida no tendría rumbo ni me meta.

Al M.C. Enrique Hernández Garibay por ser mucho más que director de tesis y recordarme el camino hacia la amistad, la familia, la confianza y el conocimiento.

Al Dr. Isaí Pacheco Ruíz por mostrarse sin etiquetas en la convivencia y el trabajo y por entusiasmarse al compartir su conocimiento, tiempo y visión de vida.

Al Dr. José Zertuche por su orientación en esta investigación.

Al M.C. Juan Manuel López Vivas por no mendigar ni condicionar su ayuda al brindarla más allá de lo creíble.

Al Biol. Alberto Gálvez Telles por mostrarme su experiencia en algas de manera ordenada.

A todos mis compañeros de laboratorio (Daniel, Paloma, Verónica, Pony, Constanza, Rigo, Víctor Macías, Estefany, Dila, Mariana, Pepe Guzmán, Santa, Claudia, Gaby, Edit., Miriam, Karla y mi brother Román) por integrarme al grupo.

Especialmente a Mariana Callejas por transmitirme tanta alegría.

A todos mis maestros por impulsarme con su enseñanza.

A todos mis compañeros de carrera que sin nombrarlos se mantienen presentes.

A María Ester y Taiguer, por fastidiarme para titularme.

A Gloria y Esteban por compartir su vida conmigo. A Bertha, Noé, Michel y Danny por mostrarme la unión familiar.

A mi familia Aviña Espinoza por quererme a través de la comida, ¡mmm quiero un pozolito!

A todos aquellos que he asesorado en educación abierta o regularización por dejarme aprender de ellos, especialmente a Antonio (Gordo) y a los estudiantes de Bimbo (José, Gabriel, Janet, Álvaro, Sergio y Lupillo) por enseñarme claramente lo que logra la voluntad. También a Teoty y Anita verdaderas amigas

A la mujer que camina a mi lado y lo hace con amor, sin ti, Rosa, no podría enfrentar sin pretextos mis contradicciones y caminar firmemente en la alegría de verte sonreír.

GRACIAS

## DEDICATORIA

A mis ancestros, primeramente a mi bisabuela Goya que me consintió de niño y me dio valor para enfrentar a la sociedad.

A mis abuelos Jesús y Angelita por aconsejarme, quererme e impulsarme a superarme.

A mi abuela Flor por enseñarme el amor a la vida y el poder de la paciencia.

A mi abuelita Chuy por tratarme como hijo sin dejar de ser mi abuelita y por todas las historias de su vida, sin su ejemplo tal vez no tararearía en la cocina recordando lo insignificantes y afortunados que somos los seres en nuestra existencia.

A mi Padre, que extraño tanto, que ancló en mí el gusto por la Universidad; sea mi tesis un pequeño homenaje a tu desempeño como ciudadano, maestro, investigador, directivo, esposo y padre.

A mi tío Beto que a pesar de no ser su hijo no solo me recibió en su casa para que yo pudiera estudiar Oceanología, sino que estuvo al pendiente de mi avance y formación y hoy tengo el gusto de decirle ¡termine Tío!

A toda mi familia por haber creído en mí. Tías, Tíos, Primos (especialmente a Juan Andrés por ser espejo del norte), Primas, Cuñados y Sobrinos.

A Enrique Hernández Garibay, mi amigo, por que nunca me recriminaste con enojo mis irresponsabilidades y si con tu ejemplo de compromiso y sencillez.

A mis hermanas y hermano, Aida, Roció y José Luis por ser la primera parte de mi persona y alentarme a dejar la mediocridad.

A mi querida mujer, Rosa Elba (Chiquis), mi amor de adulto; darme tan puro amor prendió en mí el deseo de dejar de morir y aceptar la responsabilidad de vivir.

Finalmente dedico esta tesis a mi madre, Evelia Soria García, primero por su cariño tan dulce durante mi niñez; segundo por la confianza, el apoyo y las oraciones para que cumpliera mis sueños de juventud a pesar de que ello le causo dolor por mi partida; tercero por no perder la fe de que me titularía después de haber egresado y dejar pasar tantos años y por último porque desde la muerte de nuestro padre, ella no solo me a sostenido y guiado en las coyunturas de mi vida sino que lo ha hecho con mis hermanas y hermano evitando que nuestra familia se fragmentara y terminando la labor que tanto mi padre como ella compartían. Gracias mamá, esta tesis es ante todo por ti y para ti.

Resumen de la tesis de Ramón Meza Soria que presenta como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Oceanología. Ensenada, Baja California, México.

Agosto de 2008.

## EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA COMPOSICIÓN DEL ALGA VERDE *Ulva clathrata* EN CONDICIONES DE CULTIVO

Con el propósito de conocer el efecto de la temperatura en la composición del alga *Ulva clathrata* (Clorophyta) y evaluar los cambios que ocurren en el contenido y composición de sus polisacáridos solubles, se realizó un cultivo de esta especie a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30°C), manteniendo constante la irradiancia ( $150 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y el fotoperiodo (9:15 Luz: **Oscuridad**). Se realizaron 2 cosechas a los 14 y 35 días, la muestra obtenida se deshidrató a 60°C para evaluar el contenido de proteínas y polisacáridos solubles. Las proteínas se determinaron por el método microkjeldahl y los polisacáridos solubles mediante extracción en HCl 0.1 N a 60 C por 2 horas; en los polisacáridos solubles se determinó el contenido de proteínas por el método colorimétrico de Bradford, carbohidratos totales por el método de fenol-acido sulfúrico y sulfatos por turbidimetría con cloruro de bario. Los resultados obtenidos, muestran que esta especie crece en cultivo, sin generar esporas en todo el rango de temperaturas (15 a 30°C); la tasa de crecimiento en cultivo fluctuó entre  $1.8 \pm 0.2$  a  $3.2 \pm 0.2\%$  peso día<sup>-1</sup>, donde la mayor tasa correspondió al cultivo a 15°C. Se observó que ocurre una variación en la composición química de *U. clathrata* por efecto de la temperatura de cultivo, ya que se obtuvo una variación en el contenido de proteínas y contenido de polisacáridos solubles; las proteínas variaron en una relación directa a la temperatura en un rango de  $16.5 \pm 0.6$  a  $21.5 \pm 0.8\%$ , donde el mayor contenido correspondió al cultivo de 30 °C; por otra parte el contenido de polisacáridos solubles varió de  $7.1 \pm 0.9$  a  $11.3 \pm 0.8\%$ , con el mayor porcentaje a 20°C. En el polisacárido soluble no se detectaron proteínas, sin embargo, hubo una variación en el contenido de carbohidratos totales y sulfatos; los carbohidratos totales, fluctuaron entre  $27.2 \pm 0.2$  a  $33.7 \pm 0.4\%$  con el mayor porcentaje a 25°C, mientras que el contenido de sulfatos mostró una relación inversa con la temperatura de cultivo, varió entre  $21.2 \pm 3$  y  $31.5 \pm 6.4\%$  con el mayor valor para el polisacárido obtenido del cultivo a 15°C. Se concluye que la máxima producción de biomasa se logra en cultivos de esta especie a bajas temperaturas (15°C), que también favorece la sulfatación del polisacárido; mientras que la más alta producción de proteínas ocurre a altas temperaturas (30 °C)

**ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
<b>Carta de Aprobación</b>	I
<b>Agradecimientos</b>	II
<b>Dedicatoria</b>	III
<b>Resumen</b>	IV
<b>Índice general</b>	V
<b>Índice figuras</b>	VII
<b>Índice tablas</b>	VIII
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Hipótesis</b>	5
<b>3. Objetivos</b>	5
<b>3.1</b> Objetivo general	5
<b>3.2</b> Objetivo particular	5
<b>4. Metodología</b>	6
4.1 Cultivo en incubadores	6
4.2 Análisis químicos	7
4.2.1 Proteínas	7
4.2.2 Polisacáridos solubles	8
4.2.3.1 Caracterización de Polisacáridos solubles	9
a) Carbohidratos totales	9
b) Sulfatos	9
c) Proteínas	10
4.3 Análisis Estadístico	10

<b>Continuación</b>	<b>Página</b>
<b>5. Resultados</b>	11
5.1 Cultivo	11
5.2 Análisis químicos	13
5.2.1 Proteínas	14
5.2.2 Polisacáridos Solubles	15
5.2.2.1 Caracterización de Polisacárido soluble	17
a) Carbohidratos totales	17
c) Sulfatos	19
d) Proteínas	21
<b>6. Discusiones</b>	22
<b>7. Conclusiones</b>	26
<b>8. Recomendaciones</b>	27
<b>9. Literatura citada</b>	28

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Crecimiento de <i>Ulva clathrata</i>	11
<b>Figura 2.</b> Incremento de peso húmedo de <i>Ulva clathrata</i>	12
<b>Figura 3.</b> Contenido de proteínas en <i>Ulva clathrata</i>	14
<b>Figura 4.</b> Contenido de polisacáridos solubles en <i>Ulva clathrata</i>	15
<b>Figura 5.</b> Contenido de carbohidratos totales presentes en el polisacárido soluble en <i>Ulva clathrata</i>	18
<b>Figura 6.</b> Contenido de sulfatos presentes en el polisacárido soluble de <i>Ulva clathrata</i>	20
<b>Figura 7.</b> Comportamiento de carbohidratos y sulfatos presentes en el polisacárido soluble de <i>Ulva clathrata</i>	22

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla I.</b> Respuesta de <i>Ulva clathrata</i>	13
<b>Tabla II.</b> Análisis estadístico ANDEVA de 2 vías para comprobar efectos de temperatura y tiempo en el contenido de proteínas en <i>Ulva clathrata</i>	14
<b>Tabla III.</b> Análisis estadístico ANDEVA de 1 vía para comprobar efecto de temperatura en el contenido de polisacárido soluble en <i>Ulva clathrata</i>	16
<b>Tabla IV.</b> Comparaciones Tukey entre temperaturas	16
<b>Tabla V.</b> Análisis estadístico ANDEVA de 1 vía para comprobar efectos por temperatura en el contenido de carbohidratos presentes en el polisacárido soluble extraído de <i>Ulva clathrata</i>	18
<b>Tabla VI.</b> Comparaciones Tukey entre temperaturas	18
<b>Tabla VII.</b> Análisis estadístico ANDEVA de 1 vía para comprobar efectos por temperatura en el contenido de sulfatos presentes en el polisacárido soluble de <i>Ulva clathrata</i>	20
<b>Tabla VII.</b> Comparaciones Tukey entre temperaturas	20

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son esenciales en la vida de los organismos vivos debido a que al emplear la energía solar por medio de la fotosíntesis, convierten las sustancias inorgánicas en compuestos de carbono tales como carbohidratos, lípidos y proteínas (metabolitos primarios); que son la base para otras sustancias más complejas (metabolitos secundarios) (Valencia-Ortiz, 1995). Probablemente los metabolitos secundarios, además de tener otras funciones, contribuyen a proteger a la planta contra insectos, bacterias, hongos y otros elementos patógenos (Salisbury y Ross, 2000). Algunos de estos metabolitos pueden mostrar cierta actividad biológica (compuestos bioactivos), con efecto terapéutico, actividad antiviral, bactericida u otras aplicaciones médicas (Valencia-Ortiz, 1995).

Los organismos marinos en general, son fuentes ricas de proteína minerales y vitaminas. En particular, las algas marinas son la única fuente de ficocoloides importantes de uso industrial, como agar, carragenanos y alginatos. Sin embargo, éstos no son los únicos metabolitos de importancia en las algas marinas (Shanmugan y Mody, 2000). En años recientes algunas compañías farmacéuticas, comenzaron a estudiar organismos marinos en la búsqueda de nuevos medicamentos a partir de productos naturales, entre ellas las algas, (Smit, 2004). Durante la década de los 80's y 90's se descubrieron en bacterias marinas, invertebrados y algas marinas, compuestos con actividad biológica y propiedades farmacológicas (Mayer y Lehmann, 2000).

Adicionalmente, algunos productos naturales asignados previamente a invertebrados marinos, se sabe hoy que provienen de metabolitos algales (Scheuer, 1990). Históricamente las algas marinas han sido una fuente rica de metabolitos con actividad farmacológica con efectos antineoplásicos, antimicrobianos y antivirales (Faulkner, 2000; Tziveleka *et al.*, 2003; Hudson *et al.*, 1999), y en el caso particular de los polisacáridos sulfatados de algas marinas como el carragenano y fucoidán, son conocidos por exhibir actividad biológica y fisiológica como antivirales, antitumorales y antioxidantes (Pereira *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2003a,b; Collic *et al.*, 1994); con algunas aplicaciones prácticas del fucoidán en el control del síndrome de la mancha blanca (WSV) en la acuicultura del camarón *Penaeus japonicus* (Takahashi *et al.*, 1998).

Actualmente el alga verde *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh, se utiliza como parte de la dieta en cultivos de camarón en el estado de Sinaloa, los resultados preliminares no publicados, arrojan una aparente ayuda en la prevención del virus de la mancha blanca (WSV). Sin embargo, se desconoce el metabolito presente en ella al que se pudiera atribuir dicha propiedad (Pacheco-Ruiz, com. per.).

En general poco se sabe de la composición química de las especies de macroalgas que crecen en Baja California y que se consideran de importancia económica (Aguilar-Rosas *et al.*, 1989), así como de muchas más que no se ubican en esta categoría y que hoy sabemos poseen metabolitos que pueden ser utilizados en la industria farmacéutica como es el caso de *U. clathrata* y mucho

menos se conocen los cambios que ocurren en su composición por efecto de factores ambientales.

Esta investigación plantea la estrategia de manipular las variables ambientales en el cultivo de una macroalga como una herramienta útil para modificar el contenido y composición de los diferentes metabolitos presentes en las macroalgas. Ejemplo de ello es el trabajo de Freile-Pelegrín *et al.* (2002), que modificaron el rendimiento y calidad del agar de *Gracilaria cornea* al tratarla con diferentes condiciones de obscuridad y salinidad. Rosales *et al.* (2005), al someter a la cianobacteria *Synechococcus* sp a diferentes concentraciones de salinidad, encontraron variaciones en el contenido de pigmentos, proteínas y carbohidratos. Lahaye y Robic (2007), mencionan que las condiciones ecofisiológicas en que crecen las algas, afectan la biosíntesis y por lo tanto la composición de polisacáridos tales como el ulván de algas verdes. Estos antecedentes, hacen suponer que algas cultivadas bajo diferentes condiciones ambientales pueden inducir cambios en los metabolitos que producen, siempre y cuando se tenga un conocimiento básico y extenso de la biología y fisiología de las algas en cultivo y de cómo los factores importantes para el crecimiento pueden ser manipulados para mejorar los rendimientos del compuesto a modificar (Lobban y Harrison, 1994).

La temperatura es un factor primario que afecta el metabolismo algal, influye directamente en la acción catalítica de enzimas específicas que controlan diferentes procesos metabólicos, tales como fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, así como la biosíntesis de polisacáridos (Lobban y Harrison, 1994).

En este sentido el presente trabajo tiene como objetivo responder la pregunta de cómo afecta el contenido de proteínas y contenido y composición de polisacáridos solubles en el alga verde *Ulva clathrata*, al modificarse la temperatura de cultivo.

## 2. HIPÓTESIS

a) El alga verde *Ulva clathrata* que se cultive a diferentes temperaturas producirá biomasa con diferente contenido de proteínas y polisacáridos solubles.

b) Diferentes temperaturas de cultivo afectarán la composición de los polisacáridos solubles de *U. clathrata*.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la temperatura en la composición de proteínas y polisacárido soluble de *Ulva clathrata* en cultivo.

### 3.2 Objetivos particulares:

- Determinar el efecto de la temperatura en el contenido de proteínas de *Ulva clathrata* en cultivo.
- Determinar el efecto de la temperatura en el contenido y composición de los polisacáridos solubles de *Ulva clathrata* en cultivo.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 CULTIVO EN INCUBADORES

Una muestra de *Ulva clathrata* proveniente de tanques de cultivo exterior en el Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO), se limpió de otras algas y organismos presentes. El alga limpia se separó en 12 fracciones de 15 g, las que se colocaron en matraces erlenmeyer esterilizados de 1 L con agua de mar filtrada (0.2  $\mu\text{m}$ ), esterilizada y enriquecida con medio Provasoli's modificado (Provasoli, 1968; Andersen, 2005). En 4 incubadores (VWR 2015) mantenidos a diferentes temperaturas (15, 20, 25 y 30°C), donde se mantuvo constante la irradiancia (150  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  con luz fría de 40 watts) y el fotoperiodo (corto 9:15 Luz: **Oscuridad**; L:O), en cada incubador, se colocó, un grupo de tres matraces cada uno con 15 g de alga. Para mantener el alga en movimiento y los niveles de CO<sub>2</sub> en el medio, a cada matraz se le suministró aire comprimido. Se realizaron cambios semanales de agua de mar (agua filtrada; 0.2  $\mu\text{m}$ ), esterilizada (15 min) y enriquecida con medio Provasoli's. Cuando fue necesario se agregó 1 mL de dióxido de germanio para evitar el desarrollo de diatomeas. Cada tratamiento se cosechó dos veces, la primera a los 14 días y la segunda a los 35 días de que inició el cultivo; después de cada cosecha se mantuvo una biomasa de 15 g, el material cosechado se deshidrató para su análisis posterior.

## 4.2 ANÁLISIS QUÍMICOS

### 4.2.1 Proteínas

Se usó el método microkjeldahl (A.O.A.C., 1990), el cual consta de tres pasos.

#### 1) Digestión

En un matraz microkjeldahl de 30 mL se introdujo 0.1 g de muestra seca y molida, 0.5 g de  $K_2SO_4$ , algunos granos de  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  y 2 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. La digestión se realizó en el digestor microkjeldahl, hasta que la mezcla quedó libre de partículas negras (color azul-verde cristalino). El blanco se hizo bajo las mismas condiciones, agregando todos los reactivos excepto la muestra. Los digeridos se dejaron enfriar, se disolvieron en agua y se aforaron a 25 mL.

#### 2) Destilación por arrastre de vapor

Para la destilación se empleó el aparato de destilación *Rapid destilation unit* (LABCONCO), se usó una alícuota de 5 mL del digerido y se agregaron 9 mL de NaOH al 40%. En la salida se colocó el matraz de recepción de destilado que contuvo 5 mL de ácido bórico saturado, más 5 mL de agua destilada con algunas gotas de indicador Shiro-Tashiro; se colectaron 40 mL del destilado.

### 3) Titulación

Se tituló con HCl 0.01 N hasta que la muestra viró de verde a violeta. El porcentaje de proteínas se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ Nitrógeno proteico (Np)} = [(mL \text{ muestra} - mL \text{ blanco}) \times N(\text{HCl}) \times 1.4] \times \text{alícuota} / (\text{Peso de la muestra en g}).$$

Donde:

N: normalidad del ácido empleada en la titulación.

Alícuota: Porción del volumen de destilado usado.

El porcentaje de proteínas se calculó multiplicando el % de Nitrógeno por el factor proteico (6.25).

#### 4.2.2 Polisacáridos Solubles

La extracción de polisacáridos solubles se realizó por triplicado, mediante una modificación del método propuesto por Percival (1964) y se empleó HCl 0.1 N. Las extracciones se realizaron sometiendo 1 g de alga seca y molida en 20 mL de HCl 0.1 N a baño maría a 60°C durante 3 horas. La solución resultante se filtró a través de un filtro Whatman No. 1. La solución filtrada se colectó y calentó a 60°C con agitación para disminuir a la mitad su volumen. A la solución concentrada se le adicionó NaOH 0.1 M hasta obtener un pH de 8, posteriormente se precipitó con

3 volúmenes de etanol concentrado, se centrifugó por 5 minutos a 4,000 rpm, el “*pellet*” obtenido se lavó dos veces con etanol al 70% por 30 min, para eliminar sales, y una vez con etanol concentrado para deshidratar; el producto se secó a 60°C en estufa de convección y se pesó.

#### 4.2.2.1 Caracterización de Polisacáridos Solubles

##### a) Carbohidratos totales

Se pesaron muestras de 20 a 50 mg del polisacárido obtenido, se disolvieron en agua destilada y se hicieron las diluciones apropiadas para obtener una concentración de trabajo entre 50 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se cuantificó el contenido de carbohidratos totales mediante la prueba de Fenol-Ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956), empleando rhamnosa como estándar (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

En tubos de ensayo, se agregaron 2mL de muestra problema y 0.5 mL de fenol al 3%; se agitó y en un movimiento rápido, se le agregaron 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Se volvió a agitar y se dejó reposar por 30 min. Posteriormente se leyó su absorbencia a 485 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Du 530 espectrofotómetro UV-VIS).

##### b) Sulfatos

Se cuantificaron empleando el método turbidimétrico de Cloruro de Bario-Gelatina propuesto por Tabatabai (1974). Se colocaron 20 mg del polisacárido en tubos con tapa hermética, se humedecieron con unas gotas de etanol y se agregaron 0.5 mL de HCl 2 N y se hidrolizó por 2 horas a 100°C. El hidrolizado se

aforó a 10 mL y se filtró. Para el análisis de sulfatos, se colocó 1 mL del hidrolizado en tubos de ensayo y se le agregaron 10 mL de HCl 0.05 N, 0.5 mL de BaCl<sub>2</sub>-Gelatin, se agitó y dejó reposar por 30 min. Posteriormente se leyó su absorbencia a 550 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Du 530 espectrofotómetro UV-VIS), la curva de calibración se hizo empleando una solución estándar de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (300 µg mL<sup>-1</sup>).

### c) Proteínas

La determinación de proteínas se hizo por duplicado mediante el método colorimétrico de Bradford (1976). En tubos eppendorf, se agregaron 0.8 mL de muestra más 0.2 mL de solución Azul Brillante de Coomassie, se mezclaron con vortex y se dejaron reposar 2 min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó su absorbencia a 550 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coulter, Du 530 espectrofotómetro UV-VIS), la curva de calibración se hizo empleando una solución estándar de suero albumina (BSA; 0.5mg mL<sup>-1</sup>).

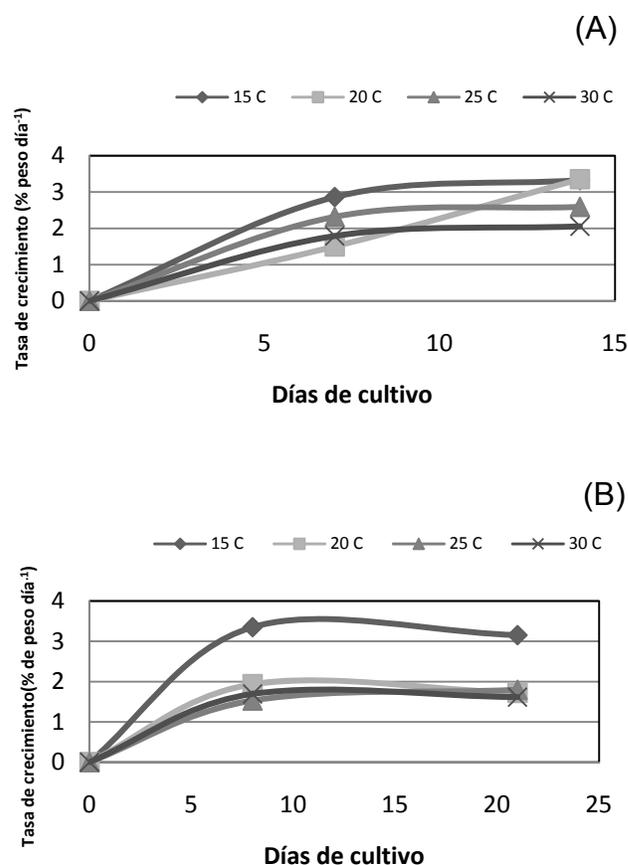
## 4.3 Análisis Estadístico

Se aplicaron ANDEVAS de una y dos vías y pruebas a posteriori Tukey (Sokal y Rohlf, 1981; Zar, 1999).

## 5. RESULTADOS

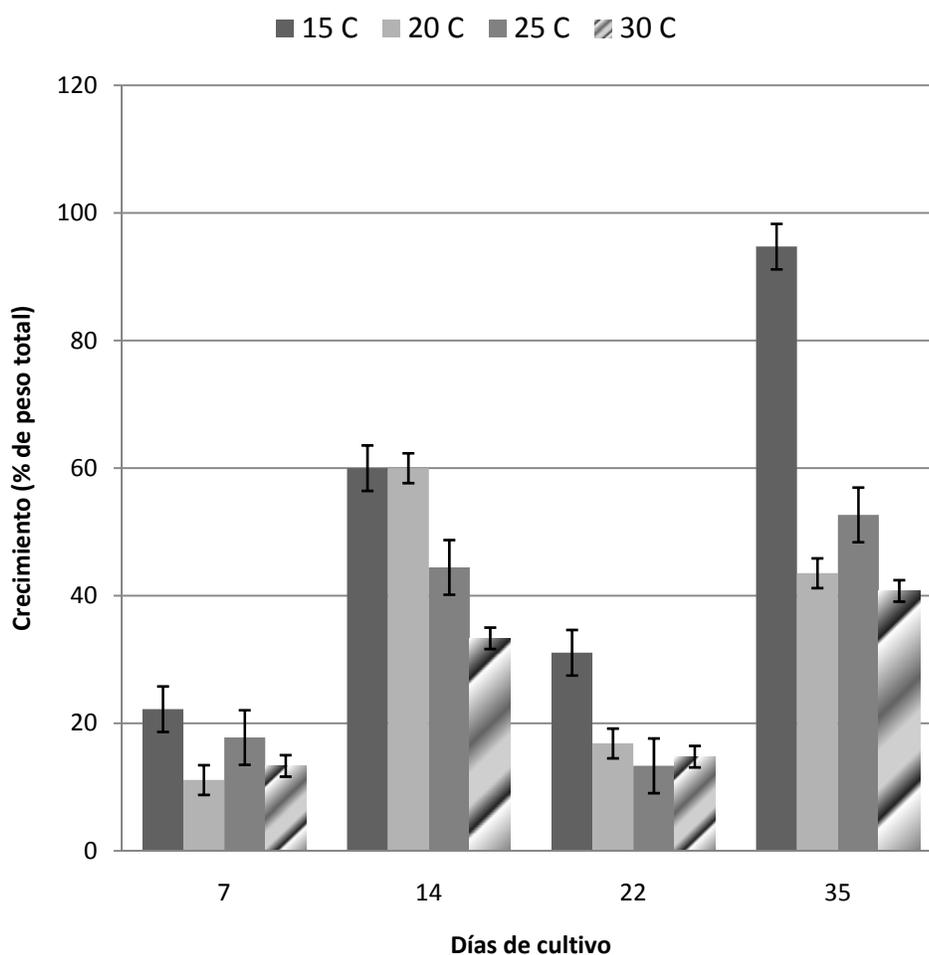
### 5.1 Cultivo

El cultivo de *Ulva clathrata* duró 35 días y durante ellos se hicieron dos cosechas. En la primer cosecha los mejores crecimientos de  $3.3 \pm 0.6$  y  $3.4 \pm 0.9$  % día<sup>-1</sup> se obtuvieron, respectivamente, a temperatura de 15 y 20°C; mientras que los más bajos de  $2.1 \pm 0.1$  a temperatura de 30 °C. En la segunda cosecha los mejores crecimientos de  $3.2 \pm 0.8$  % día<sup>-1</sup> se obtuvieron a temperatura de 15°C; mientras que los más bajos de  $1.6 \pm 0.7$ ,  $1.7 \pm 0.4$  y  $1.8 \pm 1.3$  % día<sup>-1</sup> se detectaron a temperaturas de 30, 20 y 25 °C respectivamente, (Fig. 1) .



**Fig. 1.-** Crecimiento de *Ulva clathrata* sometida a diferentes temperaturas de cultivo. (A) Primer cosecha. (B) Segunda cosecha. (n=2).

Durante el cultivo, el incremento de peso húmedo de *U. clathrata*, se alcanzó un máximo de  $94.7 \pm 3.6$  % a temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$ ; mientras que las más bajas de  $11.1 \pm 2.2$  % y  $13.3 \pm 1.7$  % se detectaron a temperaturas de  $20$  y  $30^{\circ}\text{C}$  (Fig. 2).



**Fig. 2.-** Incremento de peso húmedo de *Ulva clathrata* sometida a diferentes temperaturas de cultivo. (Barra error estándar, n=3).

De forma general el incremento de peso húmedo de *U. clathrata* cultivada a diferentes temperaturas mostró el siguiente comportamiento:  $15^{\circ}\text{C} > 20^{\circ}\text{C} \approx 25^{\circ}\text{C} > 30^{\circ}\text{C}$  (Tabla I).

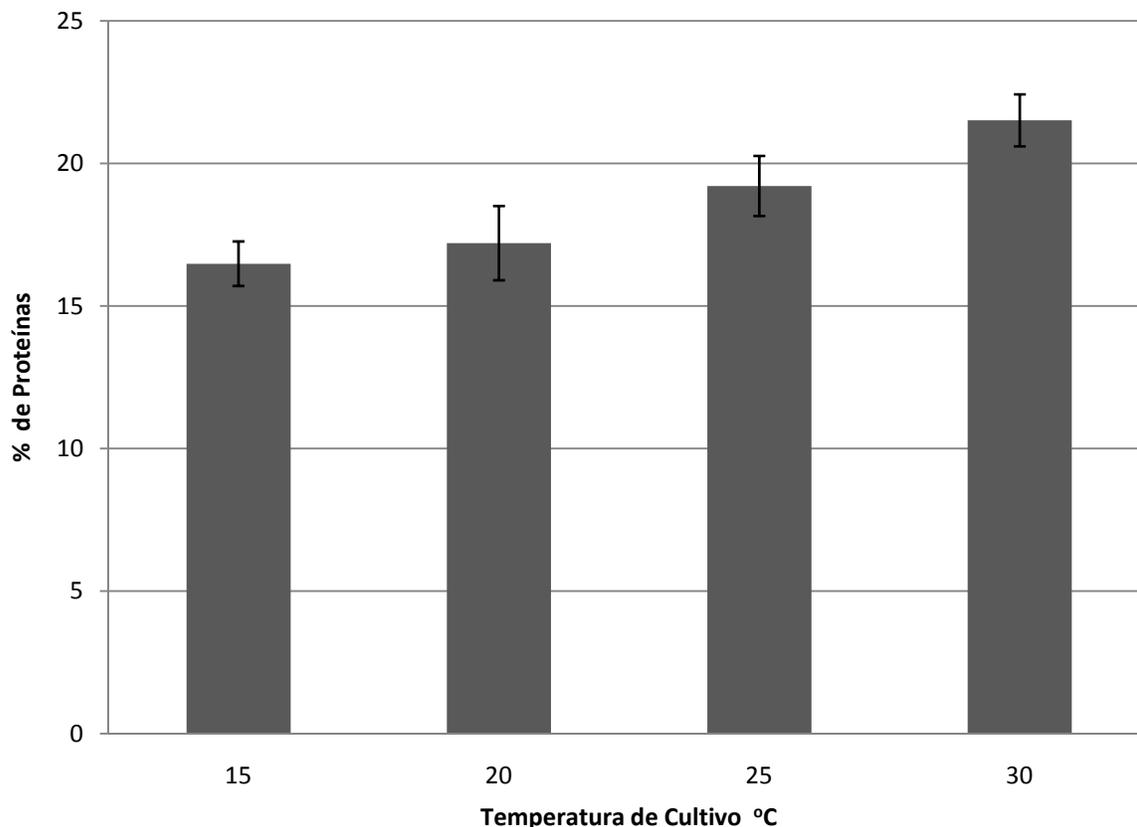
**Tabla I.** Respuesta de *Ulva clathrata* sometida a diferentes temperaturas de cultivo.

Temperaturas de cultivo ( $^{\circ}\text{C}$ )	15	20	25	30
Tasa de crecimiento ( $\% \text{ día}^{-1}$ )	3.2	2.1	2.1	1.8
Peso húmedo (%)	52.0	32.9	32.1	25.6

## 5.2 ANALISIS QUÍMICOS

### 5.2.1 Proteínas

Se detectó una relación directamente proporcional entre el contenido de proteína y la temperatura. El mayor porcentaje de  $21.51 \pm 0.83 \%$  se obtuvo a  $30^{\circ}\text{C}$  y el menor de  $17.2 \pm 1.7\%$  a  $20^{\circ}\text{C}$  (Fig. 3).



**Fig. 3.-** Contenido de proteínas en muestras de *Ulva clathrata*, cultivada a diferentes temperaturas. (Barra error estándar, n=3).

El análisis estadístico ANDEVA del contenido de proteínas contra temperatura y tiempo, no arrojó diferencias significativas ( $p < 0.050$ ) (Tabla II). Los datos fueron normales ( $p < 0.200$ ) y presentaron homogeneidad de varianza ( $p = 0.551$ ).

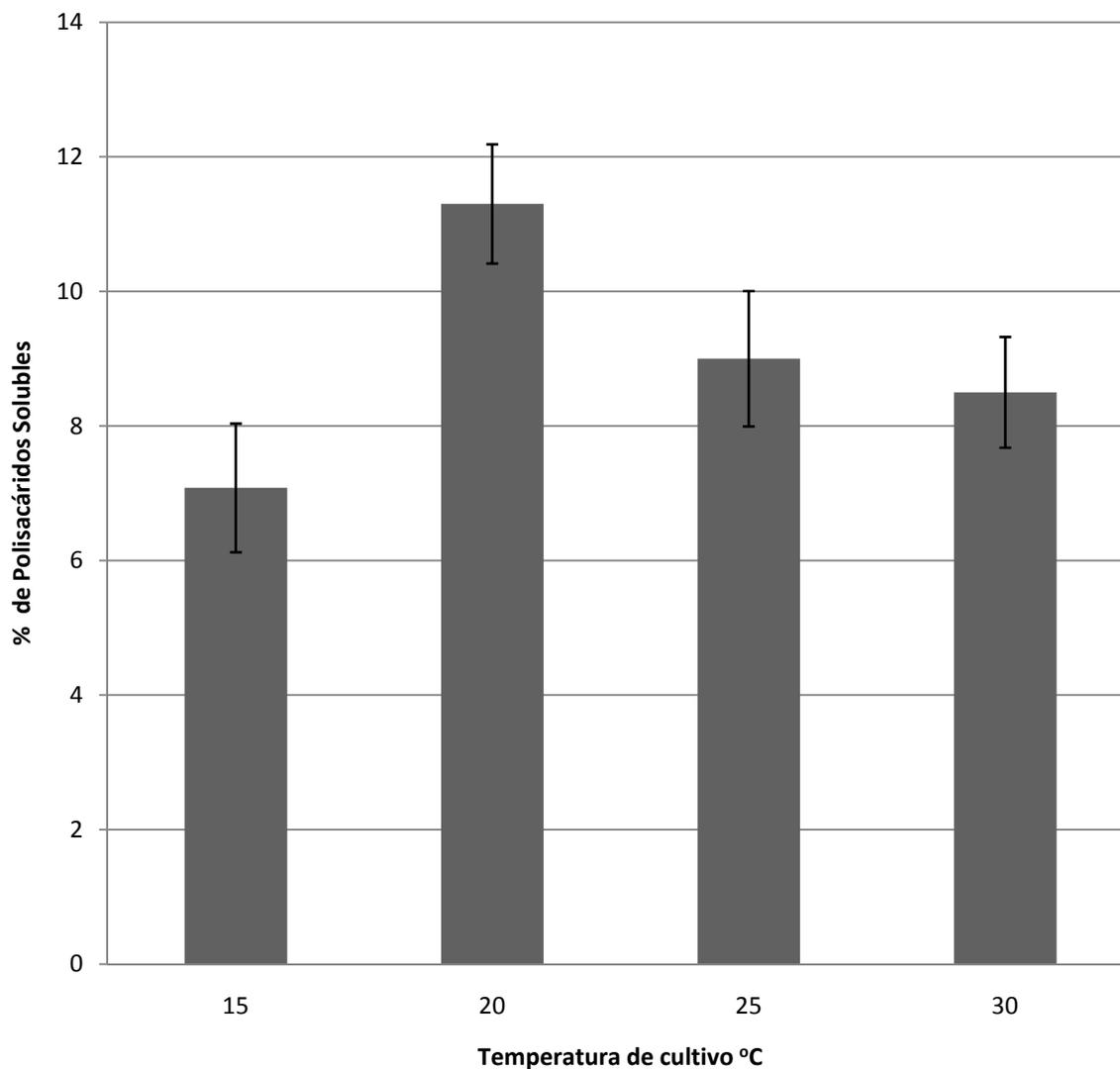
**Tabla II.** Análisis estadísticos ANDEVA de 2 vías para comprobar efectos por temperatura y tiempo de cultivo en el contenido de proteínas en *U. clathrata*.

Variación	g. l	s. c	c. m	F calc.	F crítica	P	Significancia
Temperatura	3	228.5	76.2	2.4	3.2	0.1	NS
Tiempo	1	0.1	0.1	0.0	4.5	1.0	NS
Temperatura x Tiempo	3	15.1	5.0	0.2	3.2	1.0	NS

NS = Diferencia no significativa

### 5.2.2 Polisacáridos solubles

Las bajas (15°C) y altas (30°C) temperaturas inhibieron la producción de polisacáridos solubles. El mayor contenido de polisacáridos solubles de  $11.3 \pm 0.8\%$  se obtuvo a 20°C y el menor de  $7.1 \pm 0.9\%$  a 15°C. (Fig. 4).



**Fig. 4.-** Contenido de polisacáridos solubles extraídos de muestras de *Ulva clathrata* que se cultivaron a diferentes temperaturas. (Barra error estándar, n=3).

El análisis estadístico ANDEVA arrojó diferencias significativas ( $p < 0.001$ ), respecto a la variable utilizada la temperatura (Tabla III).

**Tabla III.** Análisis estadísticos ANDEVAS de 1 vía para comprobar efecto de la temperatura en el contenido de polisacárido soluble en *U. clathrata*.

Variación	g. l	s. c	c. m	F calc.	F critica	P	Significancia
Entre grupos	3	46.1	15.4	20.4	3.2	<0.001	*

\* = Diferencia significativa

Las comparaciones a posteriori Tukey entre temperaturas no arrojó diferencias significativas entre 15, 25, 30 °C; mientras que 20 °C fue diferente a las demás (Tabla IV).

**Tabla IV.** Comparaciones Tukey entre temperaturas

Comparación (°C)	Diferencias de medias	P	Q	P	P<0.050
15 vs 20	4.2	4	10.8	<0.001	*
20 vs 30	2.8	4	7.2	<0.001	*
20 vs 25	2.1	4	5.5	0.006	*
25 vs 15	2.1	4	5.3	0.008	*
25 vs 30	0.6	4	1.7	0.647	NS
30 vs 15	1.4	4	3.6	0.085	NS

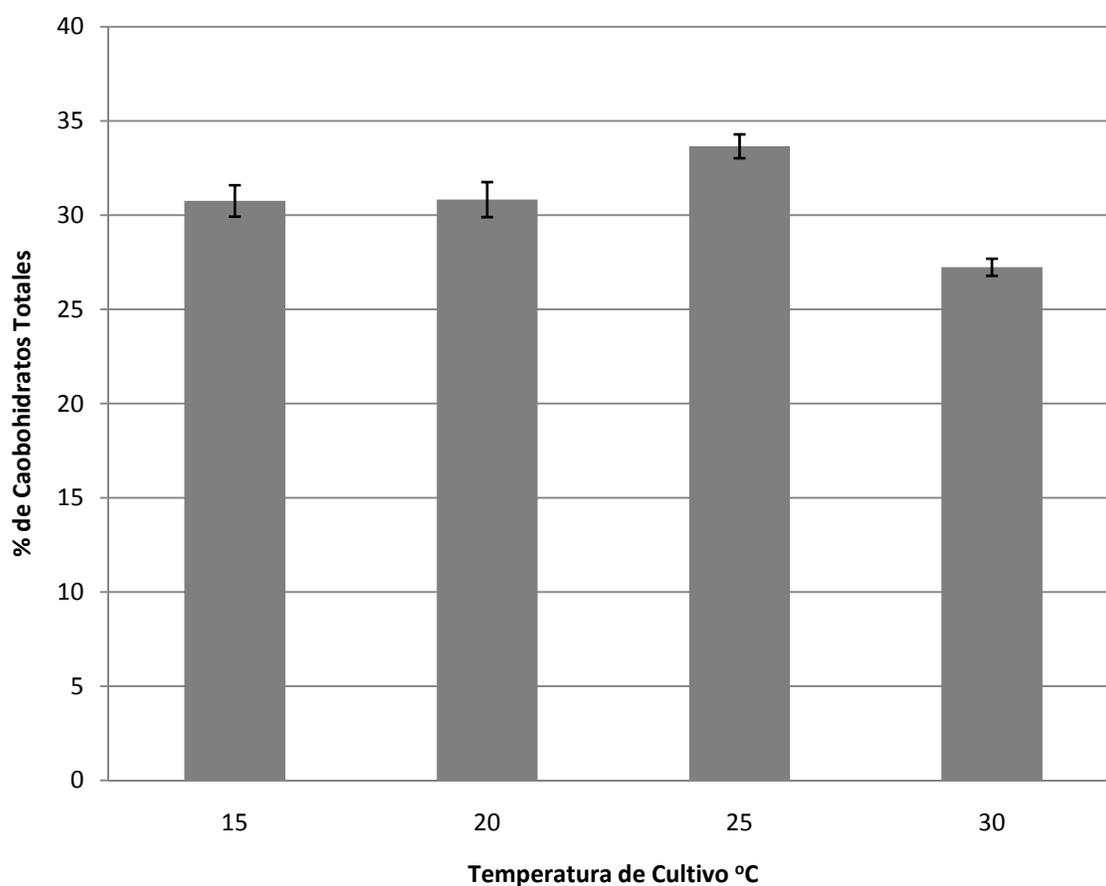
\* = Diferencia significativa

NS = Diferencia no significativa

### 5.2.2.1 Caracterización de Polisacárido soluble

#### a) Carbohidratos totales

El mayor contenido de carbohidratos totales (CHOS), en el polisacárido soluble fue de  $33.7\pm 0.4\%$  y se obtuvo de la muestra a  $25^{\circ}\text{C}$ , mientras que el menor de  $27.2\pm 0.2\%$  correspondió a la muestra a  $30^{\circ}\text{C}$  (Fig.5)



**Fig. 5.-** Contenido de carbohidratos totales presentes en el polisacárido soluble extraído de *Ulva clathrata* cultivada a diferentes temperaturas. (Barra error estándar,  $n=3$ ).

El análisis estadístico ANDEVA no arrojó diferencias significativas ( $p=0.974$ ) entre replicas; con respecto a la temperatura, las diferencias si fueron

significativas ( $p=0.010$ ) (Tabla V). Los datos fueron normales ( $p=0.498$ ) y presentaron homogeneidad de varianza ( $p=1.000$ ).

**Tabla V.** Análisis estadísticos ANDEVA de 1 vía para comprobar efectos por temperatura en el contenido de carbohidratos presentes en el polisacárido soluble extraído de *Ulva clathrata*.

Variación	g. l	s. c	c. m	F calc.	F critica	P	Significancia
Replica	1	0.00061	0.0006	0.00124	10.1	1.0	NS
Temperatura	3	43.5	14.5	29.4	9.3	0.01	*

- \* = Diferencia significativa
- NS = Diferencia no significativa

Las comparaciones Tukey muestran que hay diferencias significativas en el contenido de carbohidratos entre la temperatura de 30 °C respecto a las demás temperaturas; mientras que entre los otros tratamientos no se encontraron diferencias significativas (Tabla VI).

**Tabla VI.** Comparaciones Tukey entre temperaturas

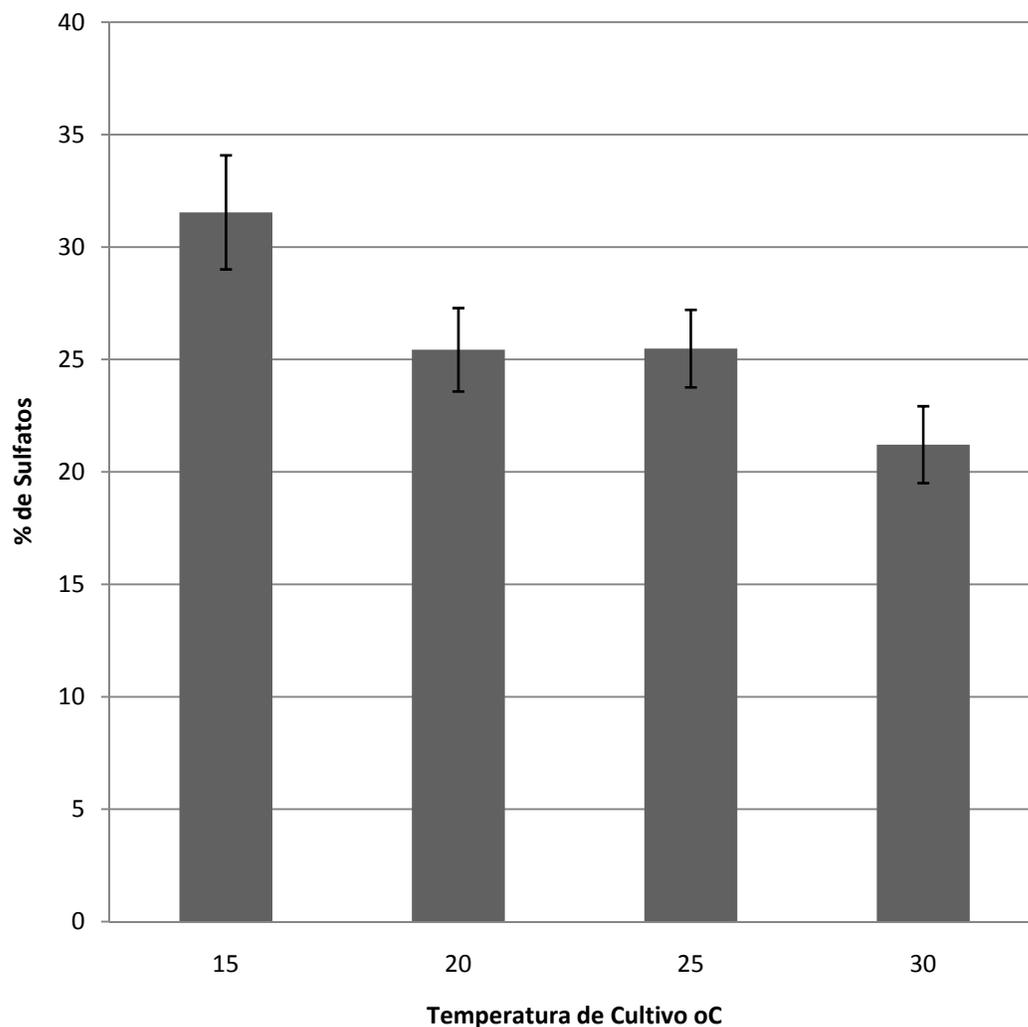
Comparación (°C)	Diferencias de medias	P	Q	P	P<0.050
25 vs 30	6.4	4	12.9	0.0	*
25 vs 20	2.8	4	5.7	0.0	NS
25 vs 15	1.9	4	3.8	0.2	NS
15 vs 30	4.5	4	9.1	0.0	*
20 vs 15	0.9	4	1.1	0.6	NS
20 vs 30	3.6	4	7.	0.0	*

\* = Diferencia significativa

NS = Diferencia no significativa

## b) Sulfatos

Se detectó una relación inversamente proporcional entre el contenido de sulfatos y la temperatura. El mayor contenido de sulfatos en el polisacárido soluble extraído fue de  $31.5 \pm 6.4\%$  a  $15^\circ\text{C}$  y el menor de  $21.2 \pm 2.9\%$  a  $30^\circ\text{C}$  (Fig. 6).



**Fig. 6.-** Contenido de sulfatos en el polisacárido soluble extraído de *Ulva clathrata* cultivada a diferentes temperaturas. (Barra error estándar,  $n=3$ ).

El análisis estadístico ANDEVA arrojó diferencias significativas ( $p=0.03$ ) respecto a la variable utilizada, la temperatura (Tabla VII).

Tabla VII. Análisis estadístico ANDEVA de 1 vía para comprobar efectos por temperatura en el contenido de sulfatos presentes en el polisacárido soluble extraído de *Ulva clathrata*.

Variable	g.l	s.c	c.m	F <sub>cal</sub>	F <sub>cri</sub>	P	Significancia
Temperaturas	3	22.1	73.7	4.2	3.5	0.03	*

\* = Diferencia significativa

Las comparaciones a posteriori Tukey entre temperaturas muestran que diferencias significativas en el contenido de sulfatos ocurren solo entre 15 y 30 °C mientras que no hubo diferencias entre las otras temperaturas (Tabla VIII).

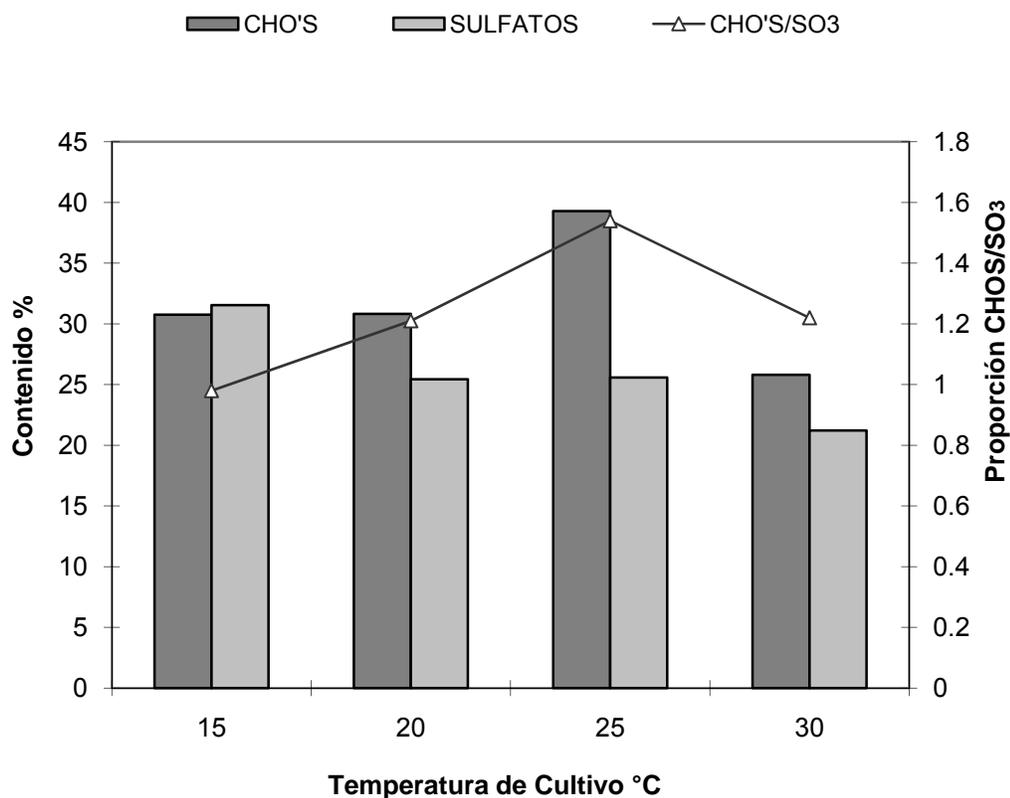
**Tabla VIII.** Comparaciones Tukey entre temperaturas

Comparación (°C)	Diferencia de medias	P	Q	P	P<0.050
15 vs. 30	10.4	4	5.0	0.0	*
15 vs. 20	6.2	4	3.0	0.2	NS
15 vs. 25	6.1	4	3.0	0.2	NS
25 vs. 30	4.3	4	2.1	0.5	NS
25 vs. 20	0.1	4	0.1	1.0	NS
20 vs. 30	4.2	4	2.0	0.5	NS

\* = Diferencia significativa

NS = Diferencia no significativa

La razón entre carbohidratos totales y sulfatos del polisacárido soluble tiene su valor mínimo a 15°C (1.0), el cual aumenta al incrementar la temperatura hasta 25°C donde se alcanza un valor máximo de 1.54 posteriormente se observa una disminución a 30°C (1.2). (Fig. 7).



**Fig. 7.-** Comportamiento de carbohidratos y sulfatos en el polisacárido soluble de *Ulva clathrata* con respecto a la temperatura de cultivo y razón entre dichas variables. (n=3).

### c) Proteínas

No se detectaron proteínas en el polisacárido soluble de *U. clathrata*.

## 6. DISCUSIONES

Al someter a *U. clathrata* a diferentes temperaturas de cultivo se observó que ocurrieron cambios en su composición general, así como en el contenido y composición de los carbohidratos de la pared celular. La temperatura es una variable que afecta directamente el metabolismo algal, ya que la disminución de la temperatura puede disminuir la actividad metabólica y un incremento de ésta provoca su aceleración, este hecho es un mecanismo que puede ser aprovechado para las rutas metabólicas e inducir la síntesis de ciertos metabolitos (Lobban y Harrison, 1994). Macler y Zupan (1991), encuentran en *Gelidium* en cultivo que altas temperaturas inhiben la asimilación de C, N y disminuye la concentración de compuestos de Carbono de bajo peso molecular mientras que incrementan los polisacáridos no metabolizables como el agar.

En este estudio se observó que en todas las temperaturas de cultivo (15 a 30°C), la planta mantuvo su crecimiento sin que ocurriera liberación de esporas, contrario a lo que encontró Navarro-Lamarque (2007) para *U. linza* cultivada en las siguientes condiciones: 10, 15, 20, 25, 30, 35°C de temperatura, irradiancias de 10, 40, 75, 150 y 300  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y tres fotoperíodos 9:15, 12:12, 15:9 (Luz:Oscuridad). Las diferencias entre ambos estudios, pueden deberse a que en esta investigación se incluyó aireación lo que favoreció el movimiento del alga y evitó que estuviera limitada por luz y CO<sub>2</sub>; esto también coincide con lo reportado por Moll y Deikman (1995) que encuentran que *Enteromorpha clathrata* puede crecer en el intervalo de temperatura de 24 a 33°C.

El incremento de peso húmedo mostró una relación inversa respecto a la temperatura de cultivo (Tabla 1) debido probablemente a que se utilizó una cepa de aguas frías (Gálvez-Télles, com. per.<sup>1</sup>).

Los resultados obtenidos, muestran que hubo una respuesta de la planta a las diferentes temperaturas de cultivo, donde la mejor tasa de crecimiento correspondió a la temperatura de 15°C (Fig. 1), lo cual coincide con el menor contenido de proteínas y de polisacárido soluble en las plantas (Fig.3 y Fig.4); además en esta temperatura el polisacárido presentó el mayor grado de sulfatación, este comportamiento coincide con lo reportado por Medcalf *et al.*, (1975) para *U. lactuca*, que encuentra un ligero incremento de sulfatos para los meses de invierno o fríos.

El contenido de proteínas en las algas en cultivo mostró una relación positiva respecto a la temperatura aplicada, donde el menor contenido correspondió a las menores temperaturas e incrementó conforme se elevó la temperatura, así a 30°C se obtuvo un máximo de 21% (Fig.3); por ello, los resultados de esta investigación concuerdan con los intervalos de proteínas (10 al 30%) reportados para el género *Ulva* por Darcy-Vrillon (1993) y con lo encontrado en las plantas que crecen en los cultivos comerciales de camarón en Sinaloa, donde temperaturas altas producen algas con un alto contenido proteico (Pacheco-Ruiz,<sup>2</sup> com. per.). Por otra parte, Renaud *et al.* (2002). reportan que ocurre un decremento en el contenido de proteínas para macroalgas tropicales

---

<sup>1</sup> Biol. Alberto Gálvez Telles. Responsable de cultivos

<sup>2</sup> Dr. Isáí Pacheco Ruíz. Director del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

australianas cultivadas a temperaturas mayores de 30°C; este comportamiento pudiera asociarse al colapso en la estructura de las proteínas que ocurre a temperaturas altas o a la interferencia con reguladores enzimáticos (Pirt, 1975); esto permite aseverar que la no interrupción del crecimiento en el intervalo de la temperatura empleada (15 a 30°C), fue por que no se llegó a inhibir el metabolismo en *U. clathrata*. Por otra parte, a pesar de la tendencia observada, el análisis estadístico, no mostró diferencias significativas entre temperaturas (Tabla II).

El contenido de carbohidratos solubles encontrado en este estudio para *U. clathrata* (7 a 11.3%), es similar al intervalo reportado por Medcalf *et al.* (1975,) para *Ulva lactuca* (8-12%).

El contenido de sulfatos detectados en *Ulva clathrata* (21-31%) fue superior a lo reportado para muestras de campo de esta especie (15.96%) por Hernández-Garibay *et al.* (2006), pero similar al reportado para *Ulva conglobata* (23-35%; Mao *et al.*, 2006) y *Ulva lactuca* (20-25%); Medcalf *et al.*, 1975). En este estudio el contenido de sulfatos disminuyó, conforme aumentó la temperatura a la cual se cultivó la especie (Fig. 6). Este comportamiento es inverso a lo reportado para algunas agarofitas (Craigie y Wen, 1984, Macler y Zupan, 1991, Cosson *et al.*, 1995), y para la carragenofita *Chondracanthus pectinatus* (López-Acuña *et al.*, 2002).

Al comparar las razones entre carbohidratos totales y sulfatos en *Ulva clathrata* se observa que a 25°C, se obtuvo la razón máxima, ya que incrementó en forma desproporcionada el contenido de carbohidratos respecto a los sulfatos; cabe mencionar que a 25 °C, durante la segunda cosecha, ocurrió un decremento en el crecimiento de 0.78 a 0.34% día<sup>-1</sup>; estas variaciones posiblemente representan la reacción de la planta a condiciones de estrés, que provocan como respuesta que la biosíntesis se oriente hacia la producción de carbohidratos de reserva (almidón) y no de polisacáridos estructurales (Lobban y Harrison, 1994). Dawes (1981), propone que cambios estacionales en el contenido de lípidos, carbohidratos y proteínas son posibles indicadores del estado fisiológico, en este sentido se sugiere analizar los polisacáridos constituyentes de la fracción soluble, para detectar la posible presencia de almidón.

A pesar de que los polisacáridos solubles de las clorofitas son polisacáridos de la pared celular y es común que en su estado nativo formen complejos con fracciones de proteínas (Kloareg y Quatrano, 1988), en este estudio no se detectó proteínas asociadas al polisacárido soluble lo cual coincide con lo reportado para *U. conglobata* por Mao *et al.*, (2005), pero difiere a lo reportado para *U. clathrata* (44.25%) por Hernández-Garibay, *et al.*, (2006), esto quizás se deba a diferencias metodológicas (Lahaye y Robic, 2007), o a que los organismos estudiados por Hernández-Garibay y colaboradores crecieron en condiciones de cultivos exteriores.

## 7. CONCLUSIONES

1. El alga verde *Ulva clathrata* creció a temperaturas entre 15 y 30°C sin que ocurra generación y liberación de esporas.
2. La temperatura de cultivo afectó la composición de *U. clathrata*, en particular el contenido de proteínas y polisacáridos solubles.
3. El polisacárido soluble que se obtuvo de *U. clathrata*, fue del tipo Ulván; donde los principales componentes son los carbohidratos y grupos hemiester sulfato.
4. La temperatura de cultivo afectó el contenido de carbohidratos totales y sulfatos en el polisacárido soluble de *U. clathrata*.
5. El contenido de proteínas en *U. clathrata* incrementó al aumentar la temperatura de cultivo.
6. En temperaturas superiores a 20°C el contenido de polisacáridos solubles en *U. clathrata* disminuyó.
7. La concentración de sulfatos del polisacárido soluble de *U. clathrata* disminuyó al aumentar la temperatura de cultivo de 15 a 30°C.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar el carbohidrato soluble de *Ulva clathrata* y evaluar carbohidratos que lo componen, peso molecular, proteínas y grado de sulfatación.
2. Someter a condiciones de estrés las algas en cultivo con el propósito de evaluar los cambios en contenido y composición de los polisacáridos solubles, además de evaluar si la biosíntesis se dirige a la producción de carbohidratos de reserva (almidón) o incrementan los polisacáridos sulfatados.
3. Realizar bioensayos en camarones con el carbohidrato soluble de *Ulva clathrata*, cultivada en altas temperaturas 30°C, para determinar su efecto en la inhibición del virus de la mancha blanca (wsv).
4. Evaluar la bioactividad de los polisacáridos en base a su composición y estructura.

## 8. LITERATURA CITADA

Andersen, R.A. (2005). Algal culturing techniques. Elsevier Academic Press. China, 578 pp.

Aguilar Rosas, L.E. (1989). El alga gigante *Macrocystis pyrifera* (Sargazo gigante) en Baja California. BOLETIN DEL IIO DE LA UABC y en el Periódico de divulgación EL MIRADOR, Junio, Año 2(9): 19-22.

A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> edition. AOAC. Washington, D.C. 556 pp.

Bradford, M.M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding". Analytical. Biochemistry, 72: 248-254.

Craigie, J.S. and Wen Z.C. (1984). Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tickvahiae* (Rhodophyceae). Canadian Journal of Botany, 62: 1665-1670.

Colliec, S., Boisson-Vidal, C. and Jozefonvicz, J. (1994). A low molecular weight fucoidan fraction from the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry*, 35: 697-700.

Cosson, J., Deslandes, E., Zinoun, M. and Mouradi Givernaud A. (1995). Carrageenans and agar, red algal polysaccharides. *Progress in Phycological Research*, 11: 269-323.

Darcy Vrillon, B. (1993). Nutritional Aspects of the Developing use of Marine Macroalgae for the Human Food Industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44: 23-35.

Dawes, C.J. (1981). *Botánica Marina*. Editorial Limusa, México, 670 pp.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956). Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.

Faulkner, D.J. (2000). Marine natural products. *Natural Products Report*, 17: 7-55.

Freile Pelegrín, Y., Robledo, D., Pedersén, M., Bruno, E. y Rönnqvist, J. (2002). Efecto del tratamiento de oscuridad y salinidad en el rendimiento y calidad de agar de *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae). *Ciencias Marinas*, 28(3): 289-296.

Hudson, J.B., Kim, J.H., Lee, M.K., DeWreede, R.E. and Hong, Y.K. (1999). Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *Journal of Applied Phycology*, 10: 427-434.

Hernández Garibay, E., Rodríguez Gamboa, A., Pacheco Ruíz, I., Guardado Puentes, J. y Bautista Alcantar, J. (2006). Polisacáridos sulfatados del alga verde *Enteromorpha clathrata*. V Congreso Mexicano de Ficología. Guadalajara, México.

Kloareg, B. and Quatrano, R.S. (1988). Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography Marine Biology Annual Review*, 26: 259-315.

Lahaye, M. and Robic, A. (2007). Structure and Functional Properties of Ulvan a Polysaccharide from Green Seaweeds. *American Chemical Society*, 8(6): 1765-1774

Lobban, C. S. and Harrison, P. J. (1994). Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press. USA, 366 pp.

López Acuña, L.M., Pacheco Ruíz, I. Hernández Garibay, E. y Zertuche González, J.A. (2002). Caracterización del carragenano de *Chondracanthus pectinatus* (Rhodophyta: Gigartinales), Ciencias Marinas, 28(3): 311-318.

Mao, W.J., Li Y, Wu, L.G., Wang, H.Q., Zhang, Y., Zang, X.X. and Zhang, H. (2005). Chemical characterization and radioprotective effect of polysaccharide from *Monostroma angicava* (Chlorophyta). Journal of Applied Phycology, 17: 349-354.

Mao, W.J., Zang, X.X., Li, Y. and Zhang, H.J. (2006). Sulfated polysaccharides from green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. Journal of Applied Phycology, 18: 9-14.

Macler, B.M. and Zupan, J.R. (1991). Physiological basis, for the cultivation of Gelidiaceae. Hydrobiología, 221: 83-90.

Mayer, A.M.S. and Lehmann, V.K.B. (2000). Marine pharmacology in 1998: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory,

anthelmintic, antiplatelet, antiportozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. *Pharmacologist*, 42: 62-69.

Medcalf, D.G., Trudy, L., Brannon, J.H. and Scott, J.R. (1975). Seasonal Variation in the Mucilaginous Polysaccharides from *Ulva lactuca*. *Botanica Marina*, 18: 67-70.

Moll, B. and Deikman, J. (1995). *Enteromorpha clathrata*: a potencial seawater-irrigated crop. *Bioresource Technology*, 52: 225-260.

Navarro Lamarque, C.L. (2007). Crecimiento y composición química de *Ulva linza* (Chlorophyta) en cultivos experimentales. Tesis de Licenciatura, ESCM, UABC, México. 59 pp.

Percival, E. (1964). Polysaccharides of the green seaweeds, *Ulva lactuca* and *Enteromorpha compressa*. *Proceeding of the International Seaweed Symposium 4*: 360-365.

Pereira, M.S., Mulloy, B. and Mourao P.A.S. (1999). Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans. Comparison between the regular, repetitive, and linear fucan from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from algae. *Journal of Biology Chemistry*, 274: 7656-7667.

Pirt, S.M. (1975). *Principles of Microbe and Cell Cultivation*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 137-142.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. *Cultures and Collections of Algae*. pp. 63-75.

Renaud, S.M., Lambridinis, G., Luong-Van, T. and Parry, D.L. (2002). Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian macroalgae grown in batch cultures. *Aquaculture* 211: 195-214.

Renaud, S.M. and Luong-Van, T. (2006). Seasonal variation in the chemical composition of tropical Australian marine macroalgae. *Journal of Applied Phycology*, 8: 381-387.

Rasales, N., Ortega, J., Mora, R. y Morales, E. (2005). Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. *Ciencias Marinas*, 31(2): 349-355.

Shanmugan, M. and Mody, H. (2000). Heparinoid-active sulphated polysaccharides from algae as potential blood anticoagulant agents. *Current Science*, 79(12): 1672-1683.

Salisbury, F. B. y Ross C. W. (2000). *Fisiología de las Plantas 2. Bioquímica vegetal*. Editorial Paraninfo, España, 230 pp.

Scheuer, P.J. (1990). Some marine ecological phenomena: Chemical basis and biomedical potential. *Science*, 248: 173-177.

Smit, A.J. (2004). Medical and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16: 245-262.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1981). *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H. Blume Ed. Rosario. Madrid, España, 832 pp.

Tabatabai, M.A. (1974). Determination of sulfates in water samples. Sulphur Institute Journal, 10: 11-13.

Takahashi, Y., Uehra, K., Watanabe, R., Okumura, T., Yamashita, T., Omura, H., Kawano, T., Kanemitsu, A., Narasak, H., Susuki, N. and Itami, T. (1998). Efficacy of oral administration of fucoidán, a sulphated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In Flegel TW (ed) *Advances in shrimp biotechnology*. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok.

Tziveleka, L.A., Vagias, C. and Roussis, V, (2003). Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(13): 1512-1535.

Valencia Ortiz, C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. Editorial Trillas. México, 235 pp.

Yu, P.Z., Li, N., Liu, X.G., Zhou, G.F., Zhang, Q.B. and Li, P.C. (2003a). Antithyperpidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research*, 48: 543-549.

Zar, J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. USA, 663 pp.