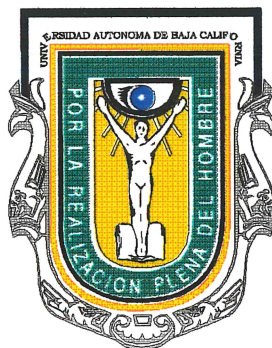


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS
CARRAGENANOS DE *Eucheuma uncinatum*
Setchell y Gardner, (Rhodophyta, Gigartinales).**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

PRESENTA

ENRIQUE HERNÁNDEZ GARIBAY

Ensenada, B.C.

Diciembre de 1997.

CARACTERIZACION FISICO-QUIMICA DE LOS CARRAGENANOS DE
Eucheuma uncinatum, Setchell y Gardner (Rhodophyta, Gigartinales).

TESIS QUE PRESENTA

Enrique Hernández Garibay

APROBADA POR :



Presidente del Jurado.
Dr. José Antonio Zertuche González.



Sinodal Propietario
Dr. Francisco Martín Goycoolea Valencia



Sinodal Propietario
M.C. Irma Esthela Soria Mercado

Ensenada Baja California, Diciembre de 1997.

RESUMEN

Las características de los carragenanos nativos producidos por el alga roja *Eucheuma uncinatum* difiere en cierta medida de las características físicas y químicas de un carragenano tipo iota.

Se realiza una caracterización físico-química, de los carragenanos nativos y con tratamiento alcalino de esta especie, mediante la determinación del contenido de 3,6-anhidrogalactosa, grupos hemiéster sulfato, espectroscopía de infrarojo, Resonancia Magnética nuclear de Carbono 13 (RMN-C13), así como la determinación de la viscosidad intrínseca y fuerza de gel, los resultados se comparan con los obtenidos para carragenanos comerciales.

Los resultados obtenidos demuestran que esta especie es productora de carragenano tipo iota, donde los carragenanos con tratamiento alcalino se aproximan en propiedades físicas y composición química a un iota ideal. La desviación observada en el carragenano nativo puede ser atribuida en gran medida a la presencia del v-carragenano precursor de iota y o, al efecto de factores ambientales.

DEDICATORIA

A mis Padres:

José María y Hermelinda, por inculcarnos la fé y superación constante.

A mi Esposa

Martha, por su apoyo incondicional y su empuje en todo momento.

A mis Hijos

Karina

Kiki y

Tania (mi secretaria y compañera en esta jornada).

Porque uno hace, pero Ustedes son el motivo.

A todos aquellos que fueron mis alumnos

Espero que hayan aprendido tanto como yo aprendí de Ustedes.

A mis Compañeros de Trabajo:

Julián Caloca Bautista

Fonseca y Toño

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California, la Facultad de Ciencias Marinas por la beca parcial otorgada para cubrir los créditos iniciales.

Al Instituto Nacional de la Pesca (SEMARNAP), por la beca otorgada de tiempo con goce de sueldo, al director del CRIP Oc. Oscar Pedrín por las facilidades otorgadas.

Al director de esta tesis Dr. José Zertuche, por el tiempo dedicado y sus acertadas sugerencias y observaciones para la realización de este trabajo.

A mis sinodales M.C. Irma Soria, por su amplia disposición y sus valiosas observaciones. Al Dr. Francisco Goycoolea, por el tiempo dedicado y sugerencias para mejorar la calidad del trabajo.

A los compañeros de macroalgas Pepe y Marco por las facilidades otorgadas.

A todos los colegas de macroalgas por su ayuda y convivencia durante mi estancia en el laboratorio :Alberto, Fernando, Isaí, Laura, Angélica, Lydia, Alejandro, Profesora Lupita y Guillermo.

A la Dra. Ma. Teresa Viana por sus orientaciones para retomar el camino.

Al Dr. Hector Rivera Carro por su orientación en todo momento.

Al Dr. Roberto Millán por su apoyo y no quitar el dedo del renglón.

Por último un agradecimiento muy especial para el Dr. J.S. Craigie por su valiosa cooperación para obtener e interpretar los espectros de RMN-C13 .

Y a Mr. Ian Burton de National Research Council, Canada por la obtención de los espectros de RMN-C13.

LISTA DE TABLAS

No.		PAGINA
Tabla 1	Unidades disacáridas repetitivas de los carragenanos y la nueva nomenclatura propuesta, (Knutsen et al., 1994).	4
Tabla 2	Porcentaje de recuperación de las algas sometidas a un proceso de despigmentación y de carragenanos sometidos a tratamiento alcalino, así como los rendimientos de carragenanos obtenidos de muestras cistocárpicas y estériles de <i>E. uncinatum</i> .	20
Tabla 3	Composición química del carragenano de <i>E. uncinatum</i> (A y B). Donde A corresponde a muestra cistocárpica, B a muestra estéril y el sufijo TA, a muestras en que se aplicó tratamiento alcalino	20
Tabla 4a	Composición química obtenida de carragenanos comerciales.	21
Tabla 4b	Composición química teórica para estructuras precursoras y terminales de carragenanos ideales.	21
Tabla 5	Equivalencia en $\mu\text{g/ml}$ para una densidad óptica de 0.1 para los azúcares estandar, carragenanos de <i>Eucheuma uncinatum</i> y carragenanos comerciales, obtenidos por el método del Fenol-Acido sulfúrico de Dubois et al. (1956).	22
Tabla 6	Viscosidad intrínseca de carragenanos de <i>Eucheuma uncinatum</i> y carragenanos comerciales, medida en viscosímetro Ubbelohde No.1, (25 °C; NaCl 0.1 M)	23
Tabla 7	Fuerza de gel de carragenanos de <i>Eucheuma uncinatum</i> y carragenanos comerciales, medidos a una concentración de 1.5 % a 20 °C.	24
Tabla 8	Razones entre intensidad de las bandas de absorción de infrarojo de los carragenanos de <i>E. uncinatum</i> y carragenanos comerciales, empleando para el cálculo de la intensidad el método de la línea base más probable (Rochas et al., 1986).	26

Tabla 9	Señales principales de Resonancia Magnética Nuclear de C13 de el carragenano de <i>Eucheuma uncinatum</i> .	30
Tabla 10	Señales menores de RMN-C13 lábiles a los álcalis presentes en el carragenano nativo de <i>Eucheuma uncinatum</i> , comparado con las señales encontradas en <i>E.spinosum</i> (Bellion et al.,1983).	31
Tabla 11	Señales de resonancia de C-13, asociadas al almidón florideano, presentes en el carragenano de <i>E.uncinatum</i> (A2), precipitado con etanol.	31
Tabla 12	Bondad de ajuste por Chi cuadrada (X^2), de los carragenanos de <i>E. uncinatum</i> , respecto a los carragenanos comerciales.	32

LISTA DE FIGURAS

No		PAGINA
Figura 1	Unidades disacáridas repetitivas en carragenanos (Craigie, 1990).	1
Figura 2	Unidades repetitivas de los carragenanos (McCandless, 1981; Greer y Yaphe, 1984a,b). Según clasificación de Craigie (1990). (Tomado de Alvarez-Colsa, 1993).	3
Figura 3	Clasificación de Carragenanos de acuerdo a especies gelificantes y potencialmente gelificantes de acuerdo a su composición (Davidson, 1980).	4
Figura 4	Hipótesis acerca de la biosíntesis de carragenanos. (A), Especies de <i>Eucheuma</i> y <i>Ahnfeltia</i> ; (B), <i>Gigartina stellata</i> ; (C), <i>Chondrus crispus</i> (Bodeau-Bellion, 1983).	6
Figura 5	Espectros de infrarojo (FTIR) del carragenano de <i>E. uncinatum</i> . Muestras cistocárpicas (A), Anat (Carragenano nativo), AAT (Carragenano con tratamiento alcalino) y A2 carragenano con tratamiento alcalino precipitado con etanol. Muestras estériles (B), Bnat (Carragenano nativo), BAT (Carragenano con tratamiento alcalino).	27
Figura 6	Espectros de infrarojo (FTIR) de carragenanos comerciales. Kappa (K), iota (ι) y lambda (λ).	28
Figura 7	Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN- C13) del carragenano nativo de plantas cistocárpicas de <i>E. uncinatum</i> (Anat). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β-D-Galactosa-4-sulfato (G) y 3,6-anhidro-α-D- galactosa- 2-sulfato (A) , se denotan como N _G y N _A respectivamente y las de ν-carragenano, β-D-Galactosa-4-sulfato (G') y α-D-galactosa-2-6-disulfato (D), como, N _{G'} y N _D .	33

- Figura 8 Espectro de RMN-C13 del carragenano con tratamiento alcalino de plantas cistocárpicas de *E. uncinatum* (A TA). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato, se denotan como N_G y N_A respectivamente. 34
- Figura 9 Espectro de RMN-C13 del carragenano con tratamiento alcalino, precipitado con etanol de plantas cistocárpicas de *E. uncinatum* (A2). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato, se denotan como N_G y N_A respectivamente y las correspondientes a la α -D-glucosa del almidón florideano como N_{Glu} . * Señales sin asignar. 35
- Figura 10 Espectro de RMN-C13 del carragenano con tratamiento alcalino de plantas estériles de *Eucheuma uncinatum* (BTA). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato, se denotan como N_G y N_A respectivamente. 36
- Figura 11 Conformación de las unidades repetitivas de nú, mú, iota y kappa carragenano.(Tomado de Guiseley et al., 1980). 45

CONTENIDO

	PAGINA
I.-INTRODUCCION	1
I.1.- Objetivo	10
II.- MATERIALES Y METODOS	11
II.1.- Obtención de muestras	11
II.2.- Carragenanos comerciales	12
II.3.- Extracción de carragenanos	12
II.3.1.- Pretratamiento	12
II.3.2.- Extracción.	12
II.3.3.- Extracción de muestra precipitada con etanol.	12
II.4.- Tratamiento alcalino.	13
II.5.- Caracterización Físico-química.	13
II.5.1.- Determinación de humedad en carragenanos.	13
II.5.2.- Cuantificación de 3,6-anHidrogalactosa	14
II.5.3.- Galactosa.	14
II.5.4.- Cuantificación de carbohidratos reductores totales.	14
II.5.5.- Cuantificación de grupos sulfato.	14
II.5.6.- Razón molar de componentes.	15
II.5.7.- Viscosidad intrínseca.	15
II.5.8.- Fuerza de gel	16
II.5.9.- Espectros de infrarojo.	16
II.5.10.- Resonancia magnética nuclear de carbono13. (RMN-C13).	16
II.5.11.-Análisis estadístico.	17

III.- RESULTADOS.	18
III.1.- Rendimientos.	18
III.2.- Contenido de 3,6-anhidrogalactosa	18
III.3.- Carbohidratos reductores totales.	18
III.4.- Contenido de ésteres de sulfato.	19
III.5.- Razón molar de componentes.	19
III.6.- Viscosidad intrínseca	22
III.7.- Fuerza de gel.	23
III.8.- Espectroscopía de infrarojo.	24
III.9.- Resonancia magnética nuclear de carbono13. (RMN-C13).	29
IV.- DISCUSION.	37
IV.1.- Rendimiento de carragenanos.	37
IV.2.- Contenido de 3,6-anhidrogalactosa y grupos hemiéster sulfato.	38
IV.3.- Razón molar de componentes.	40
IV.4.- Carbohidratos reductores totales.	41
IV.5.- Viscosidad intrínseca.	41
IV.6.- Fuerza de gel.	43
IV.7.- Espectros de infrarojo.	46
IV.8.- Resonancia magnética nuclear de carbono13. (RMN-C13).	48
IV.9.- Prueba de bondad de ajuste X^2	50
V.- BIBLIOGRAFIA.	51

I.-INTRODUCCION

Los carragenanos son una familia de polisacáridos sulfatados que se extraen con agua caliente de la pared y matriz celular de algunos géneros de algas rojas, que incluyen especies de siete familias: Solieriaceae, Rhabdoniaceae, Hypneaceae, Phyllophoraceae, Gigartinaceae, Furcellariaceae y Rhodophyllidaceae (Dawes et al., 1977a; Deslandes, et al., 1985; Craigie, 1990). Su uso en la industria farmacéutica y alimenticia, es extensa debido a sus propiedades como agente gelificante, espesante y de suspensión, entre otras (Chapman y Chapman, 1980).

Estos polisacáridos se caracterizan químicamente, por ser de cadena lineal en donde la estructura del esqueleto está formada por una secuencia alternante (A-B)_n, en la cual, residuos de β-D-galactopiranososa se unen glicosídicamente a través de las posiciones 1 y 3 (unidades A) y residuos de α-D-galactopiranososa unidos a través de las posiciones 1 y 4 (unidades B) (secuencia alternante de enlaces α (1-3) y β (1-4)) (Painter, 1983) (Fig.1).

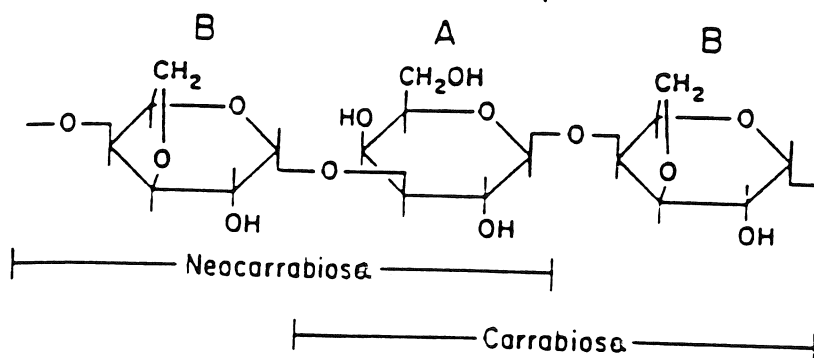


Fig. 1 Unidades disacáridas repetitivas en carragenanos (Craigie, 1990).

La estructura repetitiva A-B de la carrabiosa, contiene una proporción variable de sustituciones, principalmente grupos hemiester sulfato (OSO_3^-), que pueden sustituir cualquier grupo hidroxilo libre y el azúcar 3,6 anhidrogalactosa que puede sustituir al residuo enlazado en posición (1-4). Los carragenanos han sido clasificados con base en

este patrón de sustitución (Rees, 1963; Dolan y Rees, 1965; Anderson, et al., 1968a,b,c y 1973; Lawson et al., 1973; McCandless y Craigie, 1979; Painter, 1983; Craigie, 1990).

Las unidades repetitivas pueden ser sustituidas de diversas maneras enmascarando el patrón secuencial idealizado. La estructura repetitiva de la carrabiosa puede alterarse reemplazando la 3,6 anhidro-D-galactosa (unidad B) con residuos de D-galactopiranosas; los grupos hidroxilos pueden ser sustituidos por grupos hemiester sulfato en varios patrones o, más raro, con grupos metilo y ocasionalmente con ácido pirúvico como el grupo 4, 6-O- carboxietilideno (Craigie 1990).

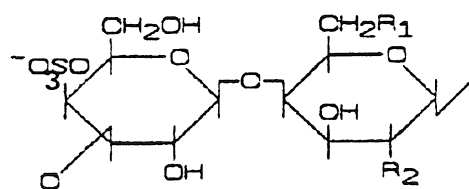
Los carragenanos de acuerdo a su composición química, se clasifican en tres familias principales: La familia Kappa (que incluye a las estructuras terminales kappa (κ), iota (ι), omicrón ($\omicron$) y sus estructuras precursoras mú (μ) y nú (ν) respectivamente; la familia Beta (estructura terminal beta (β), omega (ω) y sus precursores gamma (γ)) y; la familia Lambda (alfa (α), theta (θ), pi (π) y sus precursores delta (δ), lambda (λ) y xi (ξ) (McCandless y Craigie, 1979; Greer y Yaphe, 1984a; Craigie, 1990) (Fig.2).

Recientemente, se ha propuesto que la nomenclatura original en letras griegas sea sustituida por una nomenclatura más sistemática, basada en su composición química (Knutsen et al., 1994) (Tabla.1).

En los carragenanos, propiedades físicas tales como viscosidad y fuerza de gel están directamente relacionadas con su composición química, en donde un contenido mayor de grupos sulfatos corresponde a viscosidades mayores y menor fuerza de gel, mientras que un contenido mayor de 3,6 anhidro galactosa se relaciona a viscosidades menores y mayor fuerza gelificante (Pernas et al., 1967).

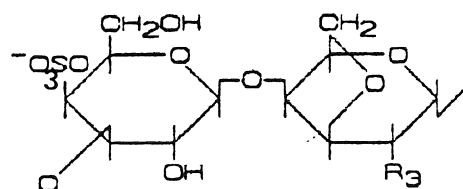
En este sentido, carragenanos del tipo lambda con un alto contenido de grupos sulfato y prácticamente sin 3,6-anhidro galactosa producen soluciones de alta viscosidad pero carecen de capacidad gelificante (Smith et al., 1955). Carragenanos del tipo kappa con un alto contenido de 3,6-anhidro galactosa, donde el principal éster sulfato es el 4S presente en la (1-3)- β -D-galactosa, tiene la capacidad de formar geles rígidos que presentan sinéresis (proceso por el cual el polisacárido excluye agua de su matriz, por congelación o, por la aplicación de presión al gel) (Guiseley et al, 1980).

FAMILIA KAPPA:



mu
nu
omicron
*

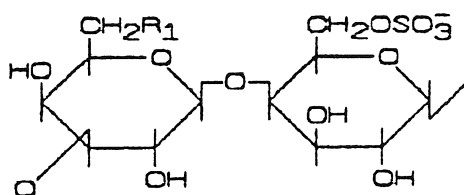
$R_1 = \text{OSO}_3^-$, $R_2 = \text{OH}$
 $R_1 = \text{OSO}_3^-$, $R_2 = \text{OSO}_3^-$
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OSO}_3^-$
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$



kappa $R_3 = \text{OH}$
iota $R_3 = \text{OSO}_3^-$

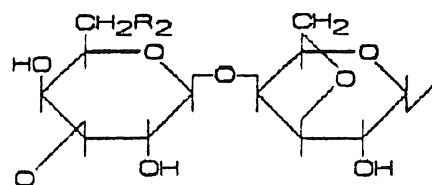
* = SIN NOMBRE

FAMILIA BETA:



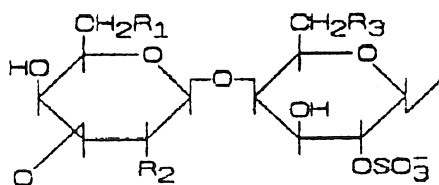
gamma
psi

$R_1 = \text{OH}$
 $R_1 = \text{OSO}_3^-$



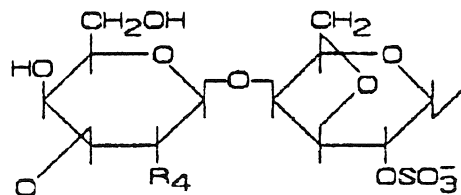
beta $R_2 = \text{OH}$
omega $R_2 = \text{OSO}_3^-$

FAMILIA LAMBDA:



delta
lambda
xi
pi

$R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OSO}_3^-$
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OSO}_3^-$, $R_3 = \text{OSO}_3^-$
 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OSO}_3^-$, $R_3 = \text{OH}$
 $R_1 = \text{PIRUVATO}$, $R_2 = \text{OSO}_3^-$, $R_3 = \text{OH}$



alpha $R_4 = \text{OH}$
theta $R_4 = \text{OSO}_3^-$

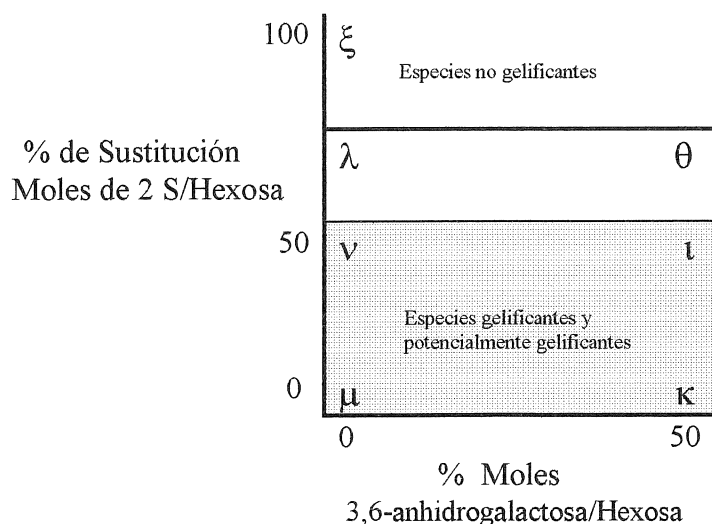
Figura 2.- Unidades repetitivas de los carragenanos (McCandless, 1981; Greer y Yaphe, 1984a,b). Según clasificación de Craigie(1990). (Tomado de Alvarez-Colsa, 1993).

Tabla No. 1: Unidades disacáridas repetitivas de los carragenanos y la nueva nomenclatura propuesta, (Knutsen et al., 1994).

Nomenclatura Anterior	Nombre Propuesto	Código de Letras
	Carragenano	G-D
α Alfa	Carragenosa 2-sulfato	G-DA2S
β Beta	Carragenosa	G-DA
γ Gamma	Carragenosa 6-sulfato	G-D6S
δ Delta	Carragenosa 2,6-disulfato	G-D2S,6S
θ Theta	Carragenosa 2,2'-disulfato	G2S-DA2S
ι Iota	Carragenosa 2,4'-disulfato	G4S-DA2S
κ Kappa	Carragenosa 4'-sulfato	G4S-DA
λ Lambda	Carragenano 2,6,2'-trisulfato	G2S-D2S,6S
μ Mu	Carragenano 6,4'-disulfato	G4S-D6S
ν Nu	Carragenano 2,6,4'-trisulfato	G4S-D2S,6S
ξ Xi	Carragenano 2,2'-disulfato	G2S-D2S
$\omicron$ Omicrón	Carragenano 2,4'-disulfato	G4S-D2S
π Pi	4',6'-O-(1-carboxietilideno) Carragenano 2,2'-disulfato	GP,2S-D2S
ψ Psi	Carragenano 6,6'-disulfato	G6S-D6S
ω Omega	Carragenosa 6'-sulfato	G6S-DA

Donde: G es la unidad enlazada en posición (1-3) y la unidad enlazada en (1-4) se denomina D en carragenanos y L en agar, DA se refiere a la unidad enlazada en (1-4) en forma de 3,6-anhidrogalactosa.

Figura No. 3: Clasificación de Carragenanos de acuerdo a especies gelificantes y potencialmente gelificantes de acuerdo a su composición (Davidson, 1980).



En el iota carragenano, además del 4 S en la unidad enlazada en 3, virtualmente toda la unidad enlazada en 4 se encuentra como 3,6-anhidrogalactosa-2-sulfato y forma geles suaves similares a la gelatina que no presentan sinéresis (Fig. 3) (Guiseley et al, 1980; Stanley, 1987).

Por otra parte, cuando sólo la mitad de los residuos de la 3,6 anhidrogalactosa se encuentran sulfatados, los geles son débiles y quebradizos, esto puede explicarse por el hecho de que moléculas de este tipo son esencialmente híbridos (mezcla de los dos tipos extremos kappa e iota) y por tanto carecen de la regularidad estructural necesaria para la formación de gel (Stancioff y Stanley, 1969).

Los carragenanos son productos finales de varios pasos enzimáticos que conducen a su biogénesis por lo que deben ser considerados como entidades heterogéneas donde ocurren variaciones en el contenido de 3,6-anhidro- α -D-galactosa y grupos sulfato, debido principalmente, a diferentes niveles de conversión de las estructuras precursoras a estructuras terminales. El grado de conversión depende, entre otros factores, del hábitat y condiciones ambientales que controlan la actividad de las sulfoeliminadas (Craigie y Wong, 1979; McCandless y Craigie, 1979; Painter, 1983 y Craigie, 1990). Bodeau-Bellion (1983) en base a estudios enzimáticos, sugiere una ruta fotosintética para iota y kappa carragenano (Fig.4).

Con base en lo anterior es raro que se reporte que un alga contenga un solo tipo de carragenano y es difícil determinar, si varios carragenanos ocurren o no como entidades químicas separadas en una mezcla de polisacáridos de la pared celular, o si se encuentran glicosídicamente enlazados a una macromolécula híbrida sencilla (Haug, 1974; Painter, 1983; Craigie, 1990). Desde este punto de vista puede ser que no existan homopolímeros (formados con un solo tipo de estructura disacárida repetitiva) y los constituyentes principales de los carragenanos varíen de especie a especie con diferentes estructuras híbridas (Pernas et al., 1967; Stancioff y Stanley, 1969; McCandless et al., 1973; Dawes et al, 1977a; Bellion, et al., 1981; Usov et al., 1980; Rochas y Heyraud, 1981; Greer y Yaphe, 1984 a y b; Knutsen y Grasdalen, 1987; Liao et al., 1993; Chiovitti et al., 1995 a y b; Piculell et al., 1981).

gelatinae y *Eucheuma speciosum*, que producen un carragenano híbrido del tipo beta-kappa-gamma (Greer y Yaphe, 1984a; Santos, 1989). *Kappaphycus alvarezii* (antes *Eucheuma cottonii*) se aproxima a un kappa carragenano ideal, aunque contiene pequeños segmentos de iota carragenano (Bellion et al., 1983; Craigie, 1990), *K. inerme*, *K. striatum*, *K. procrusteanum*, *K. cottonii* producen kappa (Santos, 1989) y *E. odontophorum*, *E. platycladum*, contienen carragenanos del tipo Kappa-iota (Santos, 1989); mientras que *E. isiforme* (*E. nudum*) contiene un carragenano híbrido del tipo Iota-nu-kappa (Greer y Yaphe, 1984b) y *E. arnoldii*, *E. spinosum*, *E. denticulatum* y *E. serra* producen iota carragenano (Dawes et al., 1977a y b; Santos, 1989 y Craigie, 1990).

El alga roja *Eucheuma uncinatum*, motivo de este estudio, es una especie endémica del Golfo de California (Norris 1975, cit por Zertuche-González 1988) se clasifica como una especie productora de carragenanos del tipo iota (Stancioff y Stanley, 1969; Lawson et al., 1973, Dawes et al., 1977b y Santos, 1979).

Stancioff y Stanley (1969) reportan para *E.uncinatum* una forma de iota carragenano, además la presencia de la estructura precursora ν carragenano. Lawson et al. (1973) reportan también que el carragenano de *E.uncinatum* corresponde a una variante de iota-carragenano que presenta un patrón de sulfatación menor al iota carragenano ideal. Por su parte Dawes et al. (1977b) encuentran que el carragenano de *E. uncinatum* presenta un nivel de sulfatación mayor al reportado por los autores anteriores el cual, posterior a un tratamiento alcalino se aproxima a la razón molar teórica de 0.5:0.5:1.0 (referido por hexosa) de un iota carragenano ideal. Bixler en 1996, clasifica a *E. uncinatum* como un carragenano híbrido del tipo iota / kappa.

Respecto a las propiedades, el carragenano nativo producido por *E. uncinatum* es incapaz de formar geles. Sin embargo, para carragenanos obtenidos en condiciones alcalinas Santos (1989) encuentra una fuerza de gel de 84 g/cm², mientras que Dawes et al. (1977b) reportan geles de alta resistencia de hasta 495 gr/cm² y Guist (1989) reporta algo similar con 506 gr/cm².

Las diferencias en composición química y propiedades antes mencionadas, respecto a carragenanos del tipo iota, plantea interrogantes acerca de la estructura de los carragenanos nativos y con tratamiento alcalino de *E. uncinatum*.

En el Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la Universidad Autónoma de Baja California, desde 1985 se ha desarrollado el cultivo *E. uncinatum* bajo diferentes condiciones de luz, nutrientes y épocas del año.

Aunque se han realizado diversos trabajos sobre la composición química de sus carragenanos, no se han analizado sus propiedades físicas (Correa-Díaz, 1987; Zertuche-González, 1988; Vega-Castro y Martínez-Rocha, 1989 y Zertuche-González et al., 1993).

A pesar de que se ha encontrado que en esta especie, independientemente del estadio de vida, localidad de colecta o estación del año, produce carragenano del tipo iota (Dawes, 1977b; Correa-Díaz, 1987; Zertuche-Gonzalez, 1988 y Zertuche-Gonzalez et al., 1993), su composición química, no siempre coincide con la composición teórica de un iota carragenano ideal.

En el presente trabajo, se estudian los carragenanos que produce *E. uncinatum* del Golfo de California y se establece su similitud en composición química y propiedades, respecto a carragenanos comerciales.

La determinación de la estructura de un polisacárido puede implicar el análisis cualitativo y cuantitativo de los monosacáridos componentes, grupos sustituyentes, conformación y tamaño molecular entre otros (Usov, 1984).

Por otra parte es difícil responder todas las interrogantes de la estructura fina acerca de la molécula de los carragenanos y generalmente es necesario el empleo de más de una técnica analítica; para este propósito, se han empleado métodos químicos, físicos, inmunológicos, enzimáticos y espectroscópicos (Bodeau-Bellion, 1983; Stevenson y Furneaux, 1991).

Ya que los carragenanos nativos están formados por una mezcla de estructuras y estas difieren considerablemente de las estructuras terminales, el tratamiento alcalino de los carragenanos puede ser un auxiliar importante en definir en forma más precisa el tipo de carragenanos que se encuentran en una especie en particular (Smidsrod, et al., 1967).

Respecto a la espectroscopía de infrarojo, como fué notado por Bellion et al. (1983) es un buen método preliminar pero no es suficientemente preciso para detectar precursores de carragenano. Peats (1981) empleando el infrarojo en forma cuantitativa, encontró una correlación entre la razón de la absorción a 805 y 845 cm^{-1} contra el

contenido de sulfatos por hexosa. De manera similar Cosson et al. (1995) encontraron que existe correlación entre la razón de la intensidad de las bandas a 1250 y 1050 cm^{-1} con el contenido de sulfatos totales. Rochas et al. (1986) en un estudio más amplio, correlacionó diferentes razones entre las intensidades de bandas respecto a la banda a 2920 cm^{-1} correspondiente al total de carbohidratos (enlace C-H) contra el grado de sulfatación en agar y carragenanos para estimar el contenido de sulfatos.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), de protón (RMN-H) y de carbono-13 (RMN-C13), es un método no destructivo que ha dado la mayoría de la información estructural en el estudio de los polisacáridos (Bhattacharjee et al. 1978; Usov, 1984). El espectro de RMN-C13, aunque de menor sensibilidad, es menos complejo que el de protón y su uso permite diferenciar entre agares y carragenanos, así como la presencia de los carragenanos κ , ι y β , aislados o incluso cuando se presentan en el mismo carragenano (Usov et al., 1980; Usov, 1984; Greer y Yaphe, 1984a; Bellion et al. 1983); además de la identificación, puede determinarse la proporción de cada componente mediante la integración del área bajo la curva de cada señal y en conjunto con técnicas tales como fraccionación o hidrólisis enzimática parecen ser promisorias para descifrar la estructura fina de carragenanos (Bellion, 1983; Usov, 1984).

En el presente trabajo, se caracterizan los carragenanos de *Eucheuma uncinatum* antes y después de un tratamiento alcalino, mediante la aplicación de métodos físicos, químicos y espectroscópicos y se comparan con carragenanos comerciales del tipo Kappa, Iota y Lambda.

I.1.-OBJETIVO:

Caracterizar los carragenanos de *Eucheuma uncinatum*, Setchell y Gardner, del Golfo de California, por medio de pruebas fisico-químicas antes y después de un tratamiento alcalino y comparar su similitud respecto a carragenanos comerciales del tipo kappa, iota o lambda.

II.-MATERIALES Y METODOS:

Se extrajeron los carragenanos nativos de especímenes cistocárpicos y estériles de *Eucheuma uncinatum*, se recuperaron de la solución por precipitación con sales cuaternarias de amonio, se obtuvo una muestra adicional se extrajo en condiciones alcalinas y se precipitó con etanol. Los carragenanos nativos fueron sometidos a un tratamiento alcalino. La caracterización físico-química de los carragenanos nativos y con tratamiento alcalino, así como de muestras comerciales, se realizó mediante la cuantificación de 3,6-anhidrogalactosa, grupos hemiéster sulfato, viscosidad intrínseca, fuerza de gel, espectroscopía de infrarojo y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN C13) (a excepción de las muestras comerciales) . Los resultados obtenidos se analizaron mediante una prueba de bondad de ajuste. Para la muestra obtenida por precipitación directa con etanol solo se obtuvieron los espectros de infrarojo y RMN C13.

II.1 Obtención de muestras:

Muestras de *E. uncinatum* fueron colectadas durante la primavera de 1995 en praderas naturales de Bahía de los Angeles, Baja Cfa. (Golfo de California) se secaron al sol hasta un contenido de humedad menor al 15 % para su conservación.

Las muestras secas fueron identificadas por comparación con muestras de herbario (Pacheco-Ruiz, com. per.). La muestra seca se fraccionó en dos submuestras: a) ejemplares cistocárpicos (A) y b) ejemplares estériles (B) (sin la presencia de estructuras reproductivas visibles). Cada submuestra se sometió a molienda en un molino de turbina con cámara de acero inoxidable hasta un tamaño de partícula de entre 60 a 100 mesh y posteriormente se separaron en tamices de 12, 32 (0.5 mm) y 42 mesh (0.355 mm).

II.2 Carragenanos comerciales:

Para fines de comparación, se emplearon los siguientes carragenanos comerciales:

Kappa: Sigma Tipo III, lote: 120H052:

Iota : Sigma Tipo V, lote: 27F0373

Lambda : Sigma Tipo IV, lote: 21H0322

II.3.- Extracción de carragenanos:

Se empleó el método descrito por Craigie y Leigh (1978).

II.3.1.- a) Pretratamiento:

El alga seca molida, con un tamaño de partícula de entre 0.35 a 0.5 mm, se despigmentó lavando dos veces con acetona, dos veces con etanol hirviendo al 80 % (v/v), dos veces con etanol concentrado y dos veces con éter etílico. Posteriormente la muestra se desecó a 60°C hasta peso constante.

II.3.2.- b) Extracción:

Tres gramos de muestra seca despigmentada se extrajeron en 450 ml de Na_2CO_3 0.5 M a 90°C por 2 horas, se filtró a vacío a través de tierra de diatomeas (dicalite 4200) empleando papel filtro Whatman # 1 y posteriormente la solución caliente se volvió a filtrar en filtro de fibra de vidrio GFC. La solución clarificada de carragenano a $T \geq 50^\circ\text{C}$ se precipitó adicionando el extracto sobre 150 ml de una solución al 5 % de cloruro de cetilpiridina (cetavión). El coágulo resultante se lavó dos veces con agua destilada, 7 veces con etanol (95%) saturado con acetato de sodio (la eliminación de cetavión fue seguida por la disminución de la absorbancia a 260 nm tal como lo sugiere Craigie et al., op.cit.), 3 veces con etanol al 95 %, eter dietílico y posteriormente se secó sobre drierita en estufa de convección a 60°C por 72 horas.

II.3.3.- Extracción de muestra precipitada con etanol:

Tres gramos de muestra seca despigmentada se extrajeron en 450 ml de NaOH 1.0 M a 90°C por 30 minutos, se filtró a vacío a través de tierra de diatomeas (dicalite 4200) empleando papel filtro Whatman # 1 y posteriormente la solución caliente se volvió a

filtrar en filtro de fibra de vidrio GFC. La solución clarificada de carragenano a $T \geq 50^{\circ}\text{C}$ se le agregan 2.6 g de cloruro de sodio (NaCl) y se precipitó adicionando el extracto sobre dos volúmenes de etanol. La fibra resultante, se lavó dos veces con etanol al 70 %, dos veces con etanol concentrado y una vez con eter dietílico, posteriormente se secó sobre drierita en estufa de convección a 60°C por 72 horas.

II.4.- Tratamiento Alcalino:

Se empleó el método descrito por Craigie y Leigh (1978).

Un gramo de carragenano de sodio se disolvió en 200 ml de agua destilada para proteger de la degradación alcalina, se agregaron 200 mg del compuesto reductor tetrahidruro de boro y sodio (NaBH_4). Se dejó en agitación a temperatura ambiente por 20 horas. Posteriormente se agregaron 600 mg adicionales de NaBH_4 y 100 ml de NaOH 3M; se mezcló y se calentó a 80°C por 7 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente, (como una modificación a la técnica descrita por Craigie y Leigh, se precipitó directamente con etanol) se le agregaron 1.7 gr de NaCl y se precipitó con dos volúmenes de etanol. La fibra resultante se lavó exhaustivamente con etanol al 70% hasta que no hubo remanentes de álcali y sales (prueba negativa para cloruros con nitrato de plata); se lavó dos veces con etanol concentrado, éter dietílico y se secó a 60°C por 72 horas.

II.5.-Caracterización Físico-química:

II.5.1.-Determinación de Humedad en Carragenanos:

El porcentaje de humedad se obtuvo gravimétricamente por diferencia de pesos, colocando el carragenano en navetas de aluminio a peso constante, se desecó sobre drierita en estufa de convección a 60°C por 72 horas y se determinó el peso seco. Debido a que los carragenanos son altamente higroscópicos, las determinaciones de humedad se realizaron simultáneamente para cada análisis, para realizar las correcciones pertinentes a cada prueba.

II.5.2.-Cuantificación de 3,6-anhidrogactosa :

Se empleó el método de resorcinol-acetal de Yaphe y Arsenault (1965) modificado por Craigie y Leigh (1978). Se usó D-fructosa como estándar y el resultado obtenido se multiplicó por el factor de corrección 1.087.

II.5.3.-Galactosa:

Se estimó por diferencia con el 100% de la suma de 3,6-anhidrogactosa y grupos sulfato, asumiendo que el carragenano contiene solo galactosa, anhidrogactosa y sulfatos (Dawes et al., 1977a).

II.5.4.- Cuantificación de Carbohidratos Reductores Totales:

Se empleó el método colorimétrico de Dubois et al. (1956). Se emplearon glucosa y galactosa como estándares. Se realizaron curvas adicionales para cada carragenano para determinar su coeficiente de extinción molar.

II.5.5.-Cuantificación de grupos sulfato:

Se empleó el método turbidimétrico de Tabatabai modificado por Craigie et al. (1984) para lo cual se colocaron de 15 a 20 mg de carragenano en tubos de ensayo de 10 x 75 mm con tapa roscada. Se humedeció con 4 gotas de etanol al 95% , se agregaron 0.5 ml de HCl 2M y se hidrolizó en baño de agua a ebullición por 2 horas.

La cuantificación se realizó en una alícuota del hidrolizado agregando el reactivo de BaCl₂-Bactogelatina, se midió la absorbancia a 550 nm. El contenido de sulfatos se determinó empleando una curva de calibración con un estándar de Sulfato de potasio (K₂SO₄).

I.5.6.-Razon Molar de componentes: Gal:AG: SO₃⁻

Para el cálculo se emplearon los pesos moleculares de las expresiones reportadas por Black et al. (1965).

Donde :

	Kappa	Iota	Lambda
Galactosa	C ₆ H ₉ O ₅	C ₆ H ₉ O ₅	C ₆ H ₁₀ O ₅
Anhidrogallactosa	C ₆ H ₈ O ₄	C ₆ H ₇ O ₄	C ₆ H ₈ O ₅ (Galactosa)
Sulfatos	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻

II.5.7.- Viscosidad Intrínseca:

Modificación del método descrito por Craigie y Leigh (1978).

Se prepararon soluciones de carragenano de entre 0.12 a 0.3 % en NaCl 0.1 M, se filtró a través de filtro de fibra de vidrio (GFC) y se deaereó a vacío por 15 minutos. A partir de las soluciones anteriores se prepararon tres diluciones más conservando constante la concentración de NaCl (0.1 M). La viscosidad se midió en un viscosímetro capilar Ubbelohde No. 1 inmerso en un baño de agua a temperatura constante (25°C).

La viscosidad intrínseca se obtiene mediante las siguientes expresiones:

$$\eta_r = \eta_s / \eta_o$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{sp} / C$$

Donde:

η_o = Tiempo de flujo del solvente
(NaCl 0.1 M)

η_s = Tiempo de flujo de la solución.

η_r = Viscosidad relativa.

η_{sp} = Viscosidad específica.

η_{sp} / C = Viscosidad específica reducida.

$[\eta]$ = Viscosidad intrínseca (ml/g)

C = Concentración (gr/100 ml)

II.5.8.- Fuerza de Gel:

Para medir la fuerza de gel se empleó una modificación del método descrito por Dawes et al., (1977a). Se preparó una solución acuosa de carragenano al 2 %; se prepararon geles de potasio agregando KCl sólido hasta una concentración de 1.0 %, la solución se calentó con agitación, a una temperatura $\geq$ a 80 °C, se corrigió el volumen, se vertió en cápsulas de plástico de 2 cm de diam. x 1.5 cm de altura y se enfrió a 10°C por 1 hora. Los geles de calcio se prepararon de manera similar usando CaCl₂ sólido. La fuerza de gel (gramos necesarios para el rompimiento) se determinó en una balanza de dos platos usando un émbolo de 1.19 cm de diámetro con un incremento de peso de 200 gr por minuto.

II.5.9.- Espectros de Infrarojo:

Se colocaron Tres mililitros de solución de carragenano al 0.4 % en una navetilla de plástico de 2.5 x 2.5 x 0.5 cm, la película se formó al deshidratar la muestra a 40°C sobre drierita en estufa de convección. Las películas transparentes de carragenanos se montaron en una cartulina y los espectros de infrarojo se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600 FTIR. Se hicieron 16 barridos para cada muestra.

La identificación de las bandas de absorción se hizo en base a los trabajos de Anderson et al. (1968b); Stancioff y Stanley (1969) y Rochas et al. (1986).

La cuantificación de las bandas resultantes se realizó por el método de la línea base más probable descrito por Rochas et al., (1986) y empleando la absorbancia total de los picos.

II.5.10.- Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-C13):

Los espectros de RMN-C13 se obtuvieron en el National Research Council of Canada, la interpretación de los mismos fué realizada por el Dr. J.S. Craigie.

Las muestras de carragenano se disolvieron en agua deuterada (D₂O) en una concentración del 4 % , los espectros se corrieron a 75 Mhz a 80°C usando un

espectrofotómetro Bruker AMX, equipado con unidad de temperatura variable. Como referencia interno se usó Dimetil sulfoxido protonado (DMSO); los datos se convirtieron a tetrametilsilano como referencia externa a 39.59 ppm. Para la detección de señales menores en el carragenano nativo y en B_{TA} se realizaron aproximadamente 140,000 barridos y las demás muestras se obtuvieron con la mitad de los barridos.

II.7.-Manejo estadístico de los datos:

Para el manejo de los resultados obtenidos de la composición de carragenanos se aplicó la ruta no paramétrica y se probó bondad de ajuste por Chi cuadrada (X^2) (Zar, 1996), el ajuste se realizó en base a contenido de 3,6-anhidrogalactosa, % de grupos sulfato, razón moles de 3,6-anhidrogalactosa/ moles de galactosa y razón moles de 3,6-anhidrogalactosa/ moles de sulfatos de los datos obtenidos para los carragenanos de *E.uncinatum* contra los datos de los carragenanos comerciales.

III.-RESULTADOS:

III.1.-Rendimientos:

El rendimiento de carragenanos de *Eucheuma uncinatum* en base seca fué de 36.7% para el material cistocárpico y de 38.7 % para el material estéril.

Por otra parte la despigmentación de las algas por los solventes, previo a la extracción, eliminó del 20.2 al 24.3 % del peso seco del alga, por lo que el rendimiento de carragenanos en base al material despigmentado es considerablemente mayor que el referido en base seca del alga intacta, esto puede observarse en la tabla 2.

Mediante el tratamiento alcalino de los carragenanos, se logró una recuperación mayor al 90 % del material original (tabla 2).

III.2.- Contenido de 3,6-anhidrogalaactosa:

El carragenano nativo obtenido de las muestras cistocárpicas y estériles de *E. uncinatum* mostraron un contenido similar de 3,6-anhidrogalaactosa aproximadamente 19 %, mientras que el tratamiento alcalino de los mismos incrementó su contenido de 3,6-AG hasta 30 a 31.5 % para ambos estadíos (tabla 3). Respecto a los carragenanos comerciales en el caso de kappa e iota se tuvieron valores de 3,6-anhidrogalaactosa cercanos a los carragenanos ideales con 32.5 y 27.7 % respectivamente, mientras que el carragenano lambda el porcentaje de este componente fué relativamente bajo con 6.5 %.

III.3.-Carbohidratos reductores totales:

Los coeficientes de extinción molar obtenido para los diferentes tipos de carragenanos no mostraron similitud con ninguno de los estandares empleados (glucosa y galaactosa). En los carragenanos comerciales kappa carragenano presentó el coeficiente de extinción molar más alto, lambda el menor y el tipo iota tuvo un valor intermedio.

Respecto a los carragenanos de *E. uncinatum*, su coef. de extinción molar cayó entre las estructuras extremas kappa y lambda carragenano, en la tabla (5) se presenta la

equivalencia del coeficiente de extinción molar ($c \cdot E_M$), donde: $c \cdot E_M$ = Densidad óptica 0.1/ Concentración $\mu\text{g/ml}$.

III.4.- Contenido de ésteres de sulfato:

El contenido de grupos sulfato en el carragenano nativo de *E. uncinatum* para la muestra cistocárpica y estéril fué de 35.4 y 36.4 % respectivamente; el tratamiento alcalino, por el cual se elimina el éster sulfato de la unidad (1-4) α -D galactosa 6-sulfato, trae consigo una disminución de entre 2 a 3% en el contenido de sulfatos para quedar con un contenido de 33.25% para los dos estadios reproductivos analizados, siendo este valor muy cercano al obtenido para iota carragenano comercial con 34.12 %, mientras que kappa carragenano comercial presentó el menor contenido con un 22.87 % y lambda el más alto con 37.89 % (tabla 3).

III.5.-Razón molar de componentes (Gal:AG: SO_3^-):

La razón molar de Galactosa/Anhidrogalactosa/Sulfatos para el carragenano nativo de *E. uncinatum* es casi idéntico para los dos estadios de vida (tabla 3), mediante el tratamiento alcalino con el incremento de la 3,6-anhidrogalactosa y el decremento del contenido de sulfatos, la razón molar para este carragenano se acerca al valor obtenido para iota carragenano comercial y a su vez a la razón molar teórica por hexosa para iota carragenano ideal (0.5/0.5/1.0) (tabla 4a y b). Kappa y lambda carragenano comercial presentaron una razón molar cercano al valor teórico de 0.5/0.5/0.5 y 1.0/0/1.0 respectivamente.

Tabla No. 2: Porcentaje de recuperación de las algas sometidas a un proceso de despigmentación y de carragenanos sometidos a tratamiento alcalino, así como los rendimientos de carragenanos obtenidos de muestras cistocárpicas y estériles de *E. uncinatum*.

Muestra	Alga Recuperada por despigmentación %	Carragenano Recuperado después del tratamiento alcalino. %	Rendimiento Carragenano % (1)	Rendimiento Carragenano % (2)
<i>Eucheuma uncinatum</i> (carposporofito) A	76.19	91.80	36.13 ± 1.51	47.42 ± 1.98
<i>Eucheuma uncinatum</i> (estéril) B	75.70	94.25	38.7 ± 1.54	51.12 ± 2.03

1) Rendimiento en base al alga seca.

2) Rendimiento en base al alga despigmentada.

Tabla No. 3: Composición química del carragenano de *E. uncinatum* (A y B).

Donde A corresponde a muestra cistocárpica, B a muestra estéril y el sufijo TA, a muestras en que se aplicó tratamiento alcalino

Muestra	Galactosa %	3,6 AG %	Sulfatos %	Razón Molar (por disacárido) Gal:AG: SO ₃ ⁻	Razón Molar (hexosa) Gal:AG: SO ₃ ⁻
A nativo	47.69	18.9 ± 1.01	35.37 ± 1.99	1:0.47:1.56	0.68:0.32:1.06
A T.A.	37.27	30.34 ± 1.33	33.26 ± 1.19	1:0.94:1.84	0.52:0.48:0.95
B nativo	45.03	18.80 ± 0.57	36.38 ± 0.44	1:0.47:1.63	0.68:0.32:1.11
B T.A.	35.26	31.56 ± 0.56	33.25 ± 1.14	1:1.02:1.91	0.50:0.50:0.95

Tabla No. 4a: Composición química obtenida de carragenanos comerciales.

Muestra	Galactosa %	3,6 AG %	Sulfatos %	Razón Molar Gal:AG:SO ₃ ⁻ (Disacárido)	RazónMolar Gal:AG: SO ₃ ⁻ (hexosa)
Kappa	44.57	32.56 ±1.76	22.99 ± 0.68	1:0.82:1.04	0.55:0.45:0.57
Lambda	55.55	6.56 ± 0.20	38.36 ± 0.78	1:0.12:1.41	0.89:0.11:1.26
Iota	38.15	27.73 ± 0.74	34.29 ± 0.7	1:0.82:1.82	0.55:0.45:1.00

Tabla N0. 4b: Composición química teórica para estructuras precursoras y terminales de carragenanos ideales.

Muestra	Galactosa %	3,6 AG %	Sulfatos %	Razón Molar Gal:AG: SO ₃ ⁻ (Disacárido)	RazónMolar Gal:AG: SO ₃ ⁻ (hexosa)
Mú	66.8	0	33.21	2.0 : 0 : 2.0	1.0 : 0 : 1.0
Kappa	41.81	37.4	20.79	1.0 : 1.0 : 1.0	0.5 : 0.5 : 0.5
Nú	55.95	0	44.05	2.0 : 0 : 3.0	1.0 : 0 : 1.5
Iota	34.69	30.81	34.50	1.0 : 1.0 : 2.0	0.5 : 0.5 : 1.0
Lambda ₁	66.79	0	39.84	2.0 : 0 : 2.0	1.0 : 0 : 1.0
Lambda ₂	57.20	0	42.80	2.0 : 0 : 3.0	1.0 : 0 : 1.5

1) Contiene 2 grupos sulfato por unidad disacárida.

2) Contiene 3 grupos sulfato por unidad disacárida.

Tabla No. 5: Equivalencia en $\mu\text{g/ml}$ para una densidad óptica de 0.1 para los azúcares estandar, carragenanos de *Eucheuma uncinatum* y carragenanos comerciales, obtenidos por el método del Fenol-Acido sulfúrico de Dubois et al. (1956).

Muestra	$\mu\text{g/ml}$ equivalente a 0.1 D.O. a 485 nm
Glucosa	10.93 ± 1.0
Galactosa	9.05 ± 0.70
A nativo	14.56 ± 1.70
A _{TA}	12.86 ± 1.30
B nativo	13.72 ± 0.57
B _{TA}	12.58 ± 1.30
Kappa	11.02 ± 1.70
Iota	13.26 ± 2.50
Lambda	14.86 ± 2.16

III.6.-Viscosidad intrínseca $[\eta]$:

Los resultados de la viscosidad de los carragenanos de *E. uncinatum* muestran un patrón de comportamiento irregular. Las viscosidades más bajas se obtuvieron para los carragenanos nativos con 166 y 277 ml/g para la muestra cistocárpica (Anat) y la muestra estéril (Bnat) respectivamente. La muestra cistocárpica con tratamiento alcalino (ATA), tuvo un valor muy cercano a los anteriores de 281 ml/g. Por su parte la muestra estéril con tratamiento alcalino (BTA) tuvo el valor más elevado de 464 ml/g comparable al obtenido para el iota-carragenano comercial con 411 ml/g. El kappa carragenano comercial presentó la viscosidad intrínseca más baja con 246 ml/g y el lambda la mayor con 565 ml/g (tabla 6).

Tabla No. 6: Viscosidad intrínseca de carragenanos de *Eucheuma uncinatum* y carragenanos comerciales, medida en viscosímetro Ubbelohde No.1, (25 °C; NaCl 0.1 M)

Muestra	Viscosidad Intrínseca [η] ml/gr
A nativo	166
A _{TA}	281
B nativo	277
B _{TA}	464
Iota	411
Kappa	246
Lambda	565

III.7.-Fuerza de gel :

El carragenano nativo de *E.uncinatum* no gelificó, independientemente del catión empleado (potasio o calcio), mientras que el carragenano con tratamiento alcalino de esta especie, gelificó con ambas sales. Con las sales de calcio se formó un gel con mayor transparencia y resistencia (160 gr/cm²) respecto al correspondiente con las sales de potasio (120 gr/cm²). Con ambas sales el gel presentó una elevada elasticidad mayor a la observada en el iota carragenano comercial, esta elasticidad influyó en la determinación, ya que antes del rompimiento el gel tuvo una deformación mayor al 75 % de su altura total (tabla 7).

Tabla No. 7: Fuerza de gel de carragenanos de *Eucheuma uncinatum* y carragenanos comerciales, medidos a una concentración de 1.5 % a 20 °C.

Muestra	Fuerza de gel gr/cm ² (dinas)		Transparencia		Tipo de gel
	KCl (0.1 M)	CaCl ₂ (0.1 M)	KCl (0.1 M)	CaCl ₂ (0.1 M)	
A nativo	No	No	++++	++++	No
A _{TA}	≥ 120 (11.77 x 10 ⁴)	≥ 160 (15.69 x 10 ⁴)	+++	+++	Elástico
Iota	50 (4.90 x 10 ⁴)	70 (68.65 x 10 ⁴)	+++	+++	Elástico
Kappa	1800 (176.53 x 10 ⁴)	1000 * (98.07 x 10 ⁴)	+	+	Rígido
Lambda	No	No	++++	++++	No

* Valor que se revisará ya que es posible que el émbolo del gelómetro tuviera cierta inclinación.

+ Valor comparativo entre muestras, donde ++++ es la máxima transparencia observada.

III.8. -Espectroscopía de Infrarojo :

Los espectros de IR del carragenano de *E.uncinatum* en sus dos estadios reproductivos, antes y después del tratamiento alcalino muestran bandas de absorción características para carragenanos del tipo iota, como es el triplete formado por los picos a 930 cm⁻¹ (anhidrogactosa), 845 cm⁻¹ (sulfato axial en C4 de la B-D-galactosa) y 805 cm⁻¹ (sulfato axial en el C2 de la anhidrogactosa). En esta misma región se observa una pequeña protuberancia a 900 cm⁻¹ ((1-3) B-D-galactosa desulfatada)) y un pico de baja intensidad a 970 cm⁻¹. Adicionalmente se presenta un pico amplio entre 1020 y 1070 cm⁻¹ y los correspondientes al total de sulfatos una banda amplia a 1250 cm⁻¹ y uno adicional más pequeño a 1370 cm⁻¹.

El efecto del tratamiento alcalino sobre el carragenano, puede ser observado por un incremento de los picos a 805, 845, 930 y 970 cm⁻¹ ésto se atribuye a la conversión de

α -D-galactosa-2-6-disulfato y / o α -D-galactosa-6-sulfato a 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa. Se logra también una disminución del pico a 1250 cm^{-1} (sulfatos totales) lo que trae consigo una mejor definición del pico a 1370 cm^{-1} . Por otra parte el tratamiento alcalino parece que no incrementa la definición del pico a 900 cm^{-1} (A_{TA} y B_{TA} en Fig 5).

El espectro de IR del carragenano de *E.uncinatum* con tratamiento alcalino del cual no se separó el almidón florideano (A_2) presenta una alta similitud con los espectros obtenidos de las muestras con tratamiento alcalino (A_{AT} y B_{AT}).

El espectro de infrarojo de iota carragenano comercial presenta los mismos picos que los descritos para *E.uncinatum*, (805 , 845 , 930 , 970 , doblete 1020 - 1070 , 1170 , 1250 y 1370 cm^{-1}), pero respecto a la intensidad de las bandas se aprecia una mayor similitud con los espectros del carragenano con tratamiento alcalino que a los del carragenano nativo.

El espectro del kappa-carragenano comercial se diferencia del iota carragenano en la carencia de la banda a 805 cm^{-1} , posee una mejor definición del pico a 900 cm^{-1} y la proporción entre las bandas a 845 y 930 cm^{-1} es mayor en kappa carragenano que la observada en iota (Fig. 6).

Respecto al lambda carragenano comercial, se distingue un número menor de bandas. Se presenta una banda amplia entre 800 y 850 cm^{-1} indicativo de la presencia de más de un tipo de éster sulfato. Se presenta también una señal a 930 cm^{-1} con intensidad moderada característica de la 3,6-anhidrogalactosa y se observa una señal intensa formada por un triplete debido a las señales a 1015 , 1025 y 1070 cm^{-1} . Se observa también, una señal débil a 1170 cm^{-1} y las bandas características del total de sulfatos a 1250 y 1370 cm^{-1} .

Además de las señales anteriores es importante mencionar la presencia en todos los espectros de una pequeña protuberancia en la región de 900 cm^{-1} ((1-3)-B-D-galactosa desulfatada)) y un doblete en la región de 705 - 735 cm^{-1} , éste último puede servir para diferenciar cualitativamente entre los diferentes tipos de carragenanos, ya que en todos los carragenanos del tipo iota las dos señales tienen aproximadamente la misma magnitud,

mientras que en los del tipo kappa la señal a 705 cm^{-1} es mayor y en el tipo lambda la señal no se presenta (Fig. 6).

El efecto del tratamiento alcalino puede ser también observado mediante el incremento de las razones 930/2920, 805/2920 y 805/845 respecto a los carragenanos nativos, ya que éstas razones son indicativas del incremento de la 3,6-anhidrogalactosa y 3,6-anhidrogalactosa -2-sulfato respectivamente (tabla 8).

Por otra parte, mediante la integración de las señales, tomando en cuenta la absorbancia total se encontró que las razones de 805/845 y 805/970 son casi equivalentes.

Por otra parte, la correlación de las razones 805/845 y 805/2920 contra la razón molar de sulfatos por hexosa mostraron un coeficiente de correlación de 0.77 y 0.73 respectivamente, en ambas razones, se obtuvo mejor correlación empleando como medida la absorbancia total de las señales que los valores obtenidos por el método de integración de la línea base.

Tabla No. 8: Razones entre intensidad de las bandas de absorción de infrarojo de los carragenanos de *E. uncinatum* y carragenanos comerciales, empleando para el cálculo de la intensidad el método de la línea base más probable (Rochas et al., 1986).

Carragenano/Razón	930/2920	805/2920	805/845
A nativo	6.27	1.88	0.55
ATA	8.67	3.01	0.69
A2	6.19	2.36	0.72
B nativo	5.80	1.59	0.49
BTA	8.67	3.14	0.67
Kappa	5.83	***	***
Iota	10.65	0.76	0.76
Lambda	1.85	***	***

*** Razones en donde una o ambas de las señales estuvo ausente.

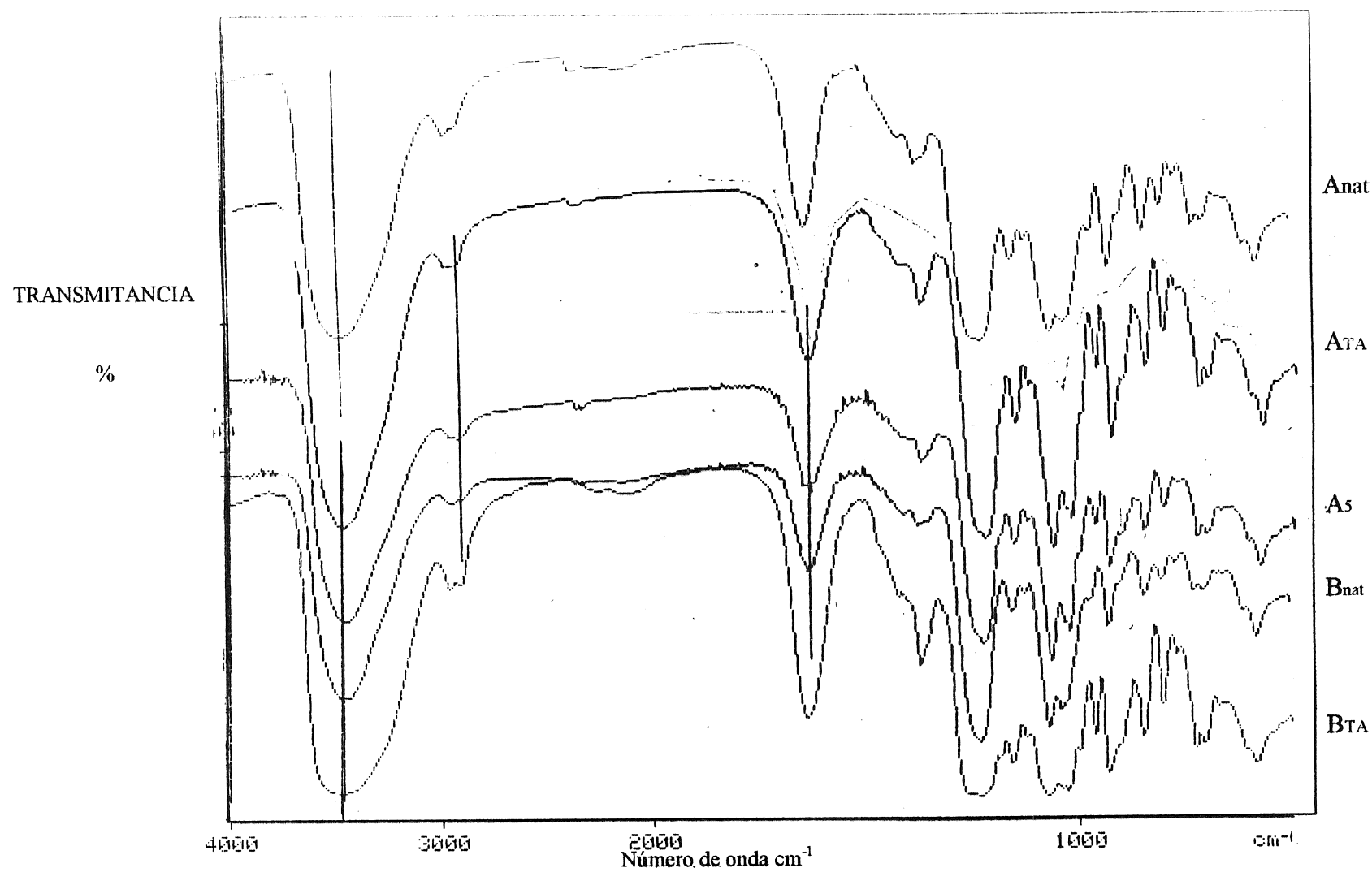


Figura 5: Espectros de infrarojo (FTIR) del carragenano de *E. uncinatum*.
Muestras cistocárpicas (A), Anat (Carragenano nativo), AAT (Carragenano con tratamiento alcalino) y A2 carragenano con tratamiento alcalino precipitado con etanol. Muestras estériles (B), Bnat (Carragenano nativo), BAT (Carragenano con tratamiento alcalino).

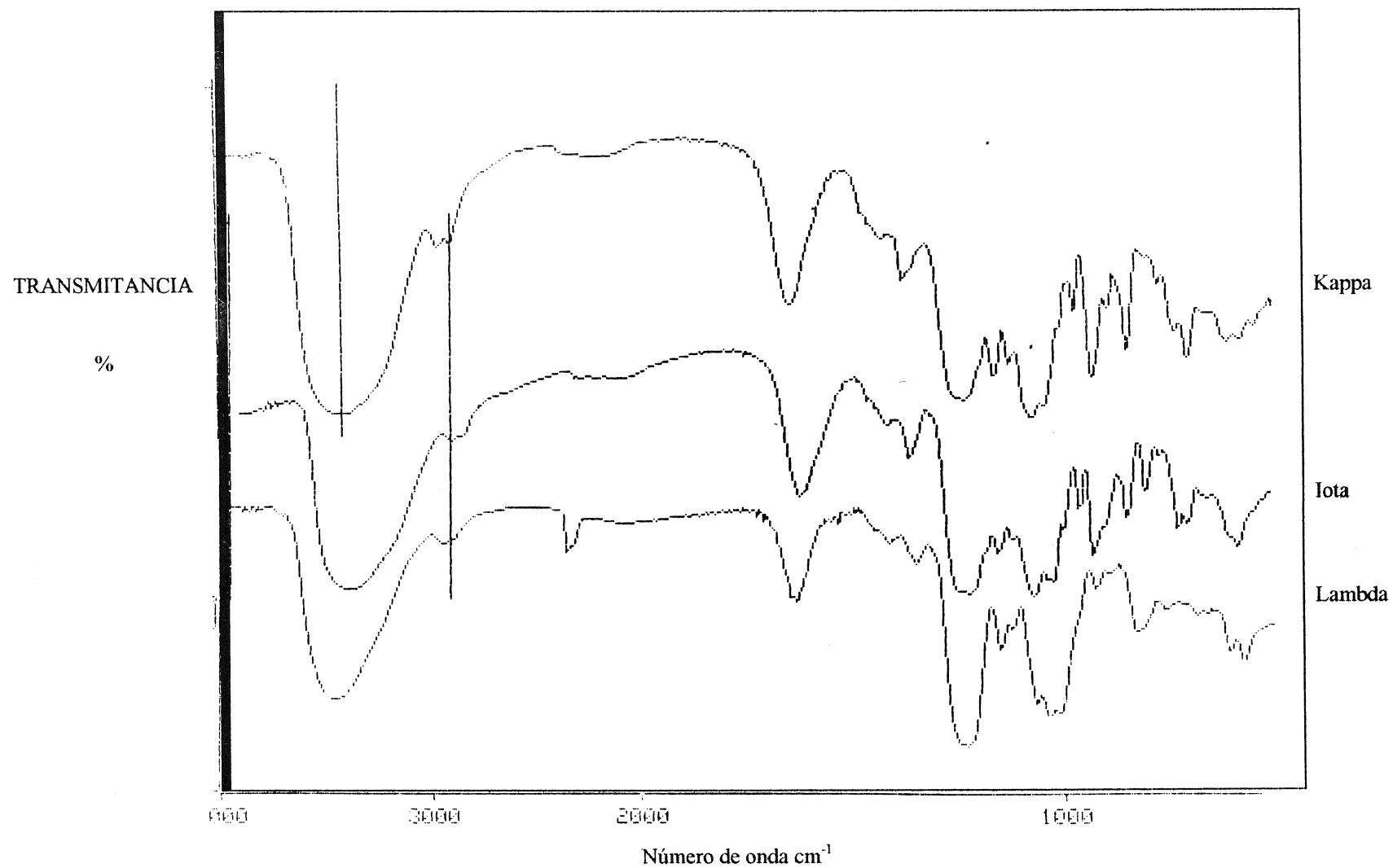


Figura 6. Espectros de infrarojo (FTIR) de carragenanos comerciales. Kappa (K), iota (ι) y lambda (λ).

III.9.-Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-C13):

El espectro de RMN-C13 del carragenano de *E. uncinatum* en sus dos fases reproductivas analizadas y la muestra que contiene almidón florideano, presentan señales características asignadas a un iota carragenano (unidad disacárida repetitiva carrabiosa 2,4-disulfato) (tabla 9).

En todos los espectros obtenidos se observan las 12 señales de los carbonos de la unidad disacárida repetitiva de galactanos sulfatados (tabla 9). Dentro de las señales emitidas por los carbonos, pueden distinguirse dos señales bien definidas una a 102.2 ppm y otra a 92.1 ppm asignadas a los carbonos anoméricos G1 y A1 respectivamente; a mayor campo se encuentra otra señal a 72.08 ppm distintiva del carbono G4 del iota carragenano (figs. 7-10).

Respecto al espectro obtenido del carragenano nativo (A nativo) (fig. 7), éste presenta en la región de los carbonos anoméricos dos señales de menor intensidad que no se observan en los carragenanos con tratamiento alcalino A_{AT}, A₂ y B_{AT} , una señal a 104.91 y otra a 98.46 ppm. Estos dos picos han sido asignados a los carbonos G1 y D1 de la estructura repetitiva del ν carragenano (G4S D2S,6S). En este espectro las señales a 68.17 y 67.86 ppm, indican la presencia del carbón sulfatado D6, el cual existe en dos ambientes químicos diferentes ambas lábiles a los álcalis ya que no se presentan en las muestras con tratamiento alcalino (tabla 10).

En el espectro A₂ , la presencia del almidón florideano se detecta por la presencia de algunas señales ausentes en los demás espectros. La señal a 100.2 ppm correspondiente al carbón anomérico C1 de la $\alpha(1-4)$ -D-glucosa y las señales a 78.1 y 73.6 ppm correspondientes a C4 y C3 de la glucosa, ocurre traslape de las señales del C2 y C5 con la señal G4 y la señal del C6 con la correspondiente al G6 del iota carragenano (fig. 9; tabla 11).

Tabla No. 9: Señales principales de Resonancia Magnética Nuclear de C13 de el carragenano de *Eucheuma uncinatum*.

Unidad	Nativo	A _{ATA}	A ₂	B _{ATA}
D-Galactosa/Carbón no.	ppm	ppm	ppm	ppm
(G)				
G1	102.24	102.27	102.26	102.28
G2	69.47	69.41	69.40	69.41
G3	~77.00	77.12	77.12	77.12
G4	72.08	72.08	72.08	72.09
G5 _a	74.96	74.97	74.97	74.98
G6	61.41	61.35	61.34	61.35
Anhidro-D-galactosa				
(A)				
A1	92.10	92.08	92.09	92.09
A2 _a	~74.9	~74.9	~74.9	74.88
A3	77.88	77.89	77.90	77.90
A4	78.23	78.36	78.34	78.37
A5	76.88	76.87	76.88	76.87
A6	69.82	69.84	69.82	69.85

Donde:

A_{TA} : Carragenano con tratamiento alcalino de la muestra cistocárpica.

B_{TA} : Carragenano con tratamiento alcalino de la muestra estéril.

A₂ : Carragenano con tratamiento alcalino de la muestra cistocárpica, precipitado con etanol.

a) Señales donde ocurre traslape de resonancias.

Tabla No. 10: Señales menores de RMN-C13 lábiles a los álcalis presentes en el carragenano nativo de *Eucheuma uncinatum*, comparado con las señales encontradas en *E.spinosum* (Bellion et al.,1983).

<i>E.uncinatum</i>	<i>E.spinosum.</i>	Asignación
Nativo		tentativa
ppm	ppm	G4S-D2,6S
104.91	104.5	G1
98.46	98.1	D1
80.30	~79.9	
	~78.2	
76.38	~76.0	
71.25	~71.0	G4?
~70.00	~69.5	
68.17	~67.9	D6
67.86	~67.5	D6

Tabla No. 11: Señales de resonancia de C-13, asociadas al almidón florideano, presentes en el carragenano de *E.uncinatum* (A2), precipitado con etanol.

Carbono no.	Almidón	Muestra A2	Comentarios
	ppm	ppm	
C1	100.2	100.23	
C2	72.1	~72.1	Con G4-iota (72.08)
C3	73.8	73.83	
C4	78.1	78.18	
C5	71.9	~71.9	Con G4-iota
C6	61.3	~61.3	Con G6-iota

III.10.- Resultados estadísticos:

Tabla No. 12 : Bondad de ajuste por Chi cuadrada (X^2), de los carragenanos de *E. uncinatum*, respecto a los carragenanos comerciales.

	A	ATA	B	BTA	K	I	L
A	***	8.9	0.19	11.4	17.94	6.14	32.28
ATA	10.23	***	9.72	0.17	6.52	0.34	103.87
B	0.19	8.13	***	10.29	19.61	5.37	32.38
BTA	12.86	0.16	12.20	***	7.01	0.86	114.5

$X^2_{crit. \alpha=0.5, 4} = 9.49$

Los valores de X^2 calculada menores a X^2 crit muestran similitud entre carragenanos; mayor similitud entre los carragenanos se obtiene cuando los valores se acercan a cero.

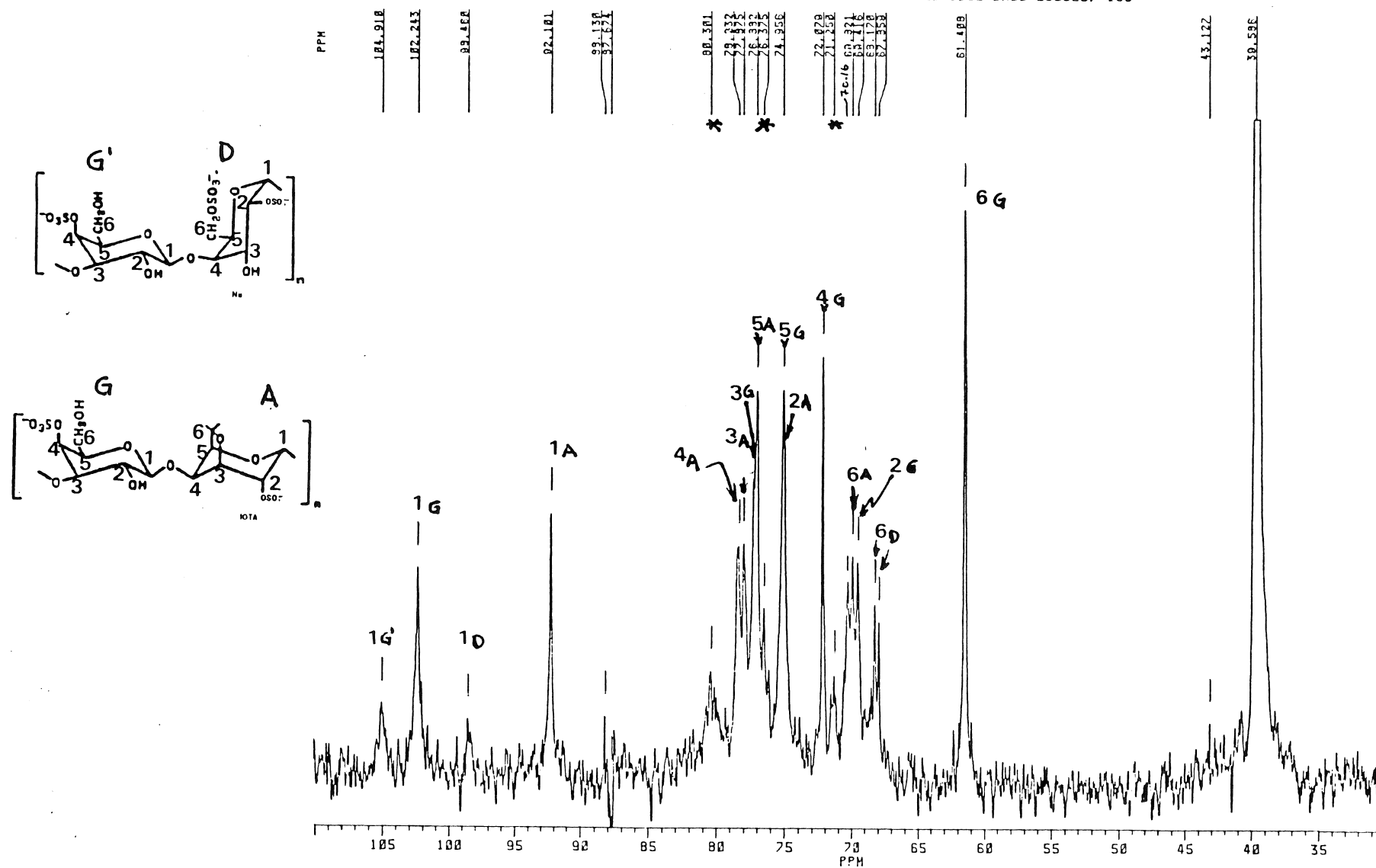


Figura 7 : Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-C13) del carragenano nativo de plantas cistocárpicas de *E. uncinatum* (A_{nat}). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato (G) y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato (A), se denotan como N_G y N_A respectivamente y las de ν -carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato (G') y α -D-galactosa-2-6-disulfato (D), como, N_{G'} y N_D.

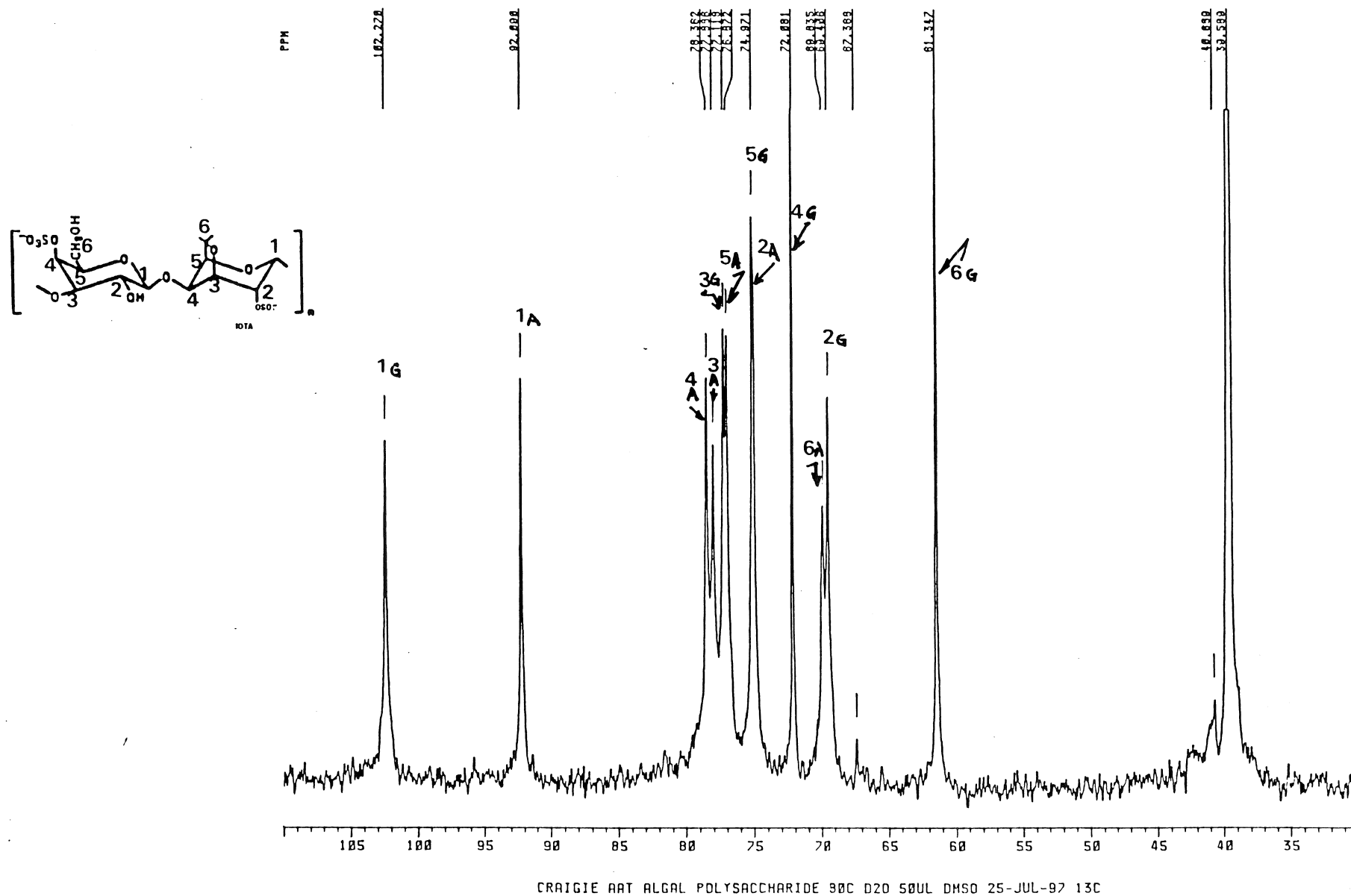


Figura 8 : Espectro de RMN- ^{13}C del carragenano con tratamiento alcalino de plantas cistocárpicas de *E. uncinatum* (A TA). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato, se denotan como N_G y N_A respectivamente.

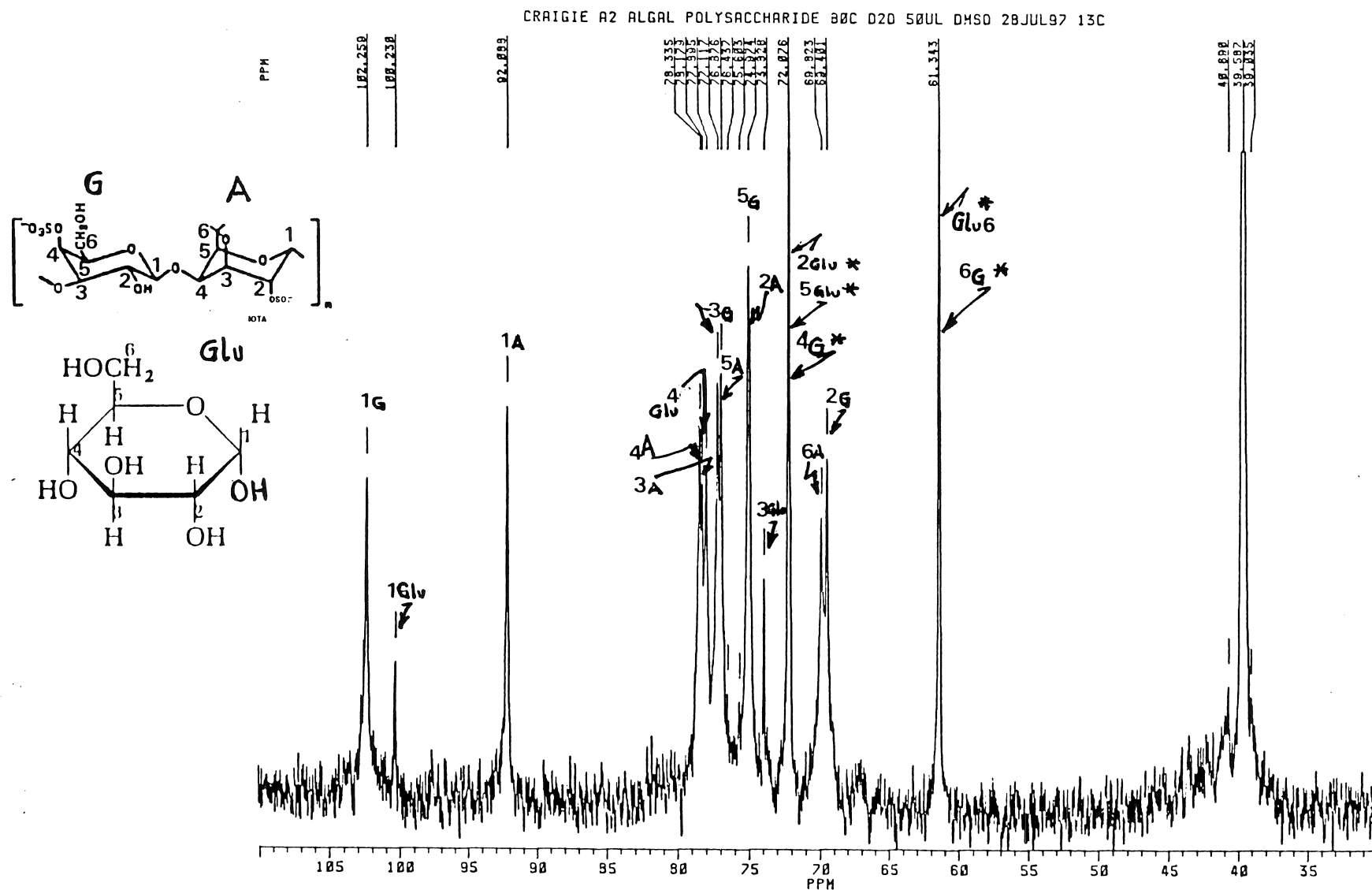


Figura 9 : Espectro de RMN-C13 del carragenano con tratamiento alcalino, precipitado con etanol de plantas cistocárpicas de *E. uncinatum* (A2). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, β -D-Galactosa-4-sulfato y 3,6-anhidro- α -D-galactosa-2-sulfato, se denotan como N_G y N_A respectivamente y las correspondientes a la α -D-glucosa del almidón florideano como N_{Glu} . * Señales sin asignar.

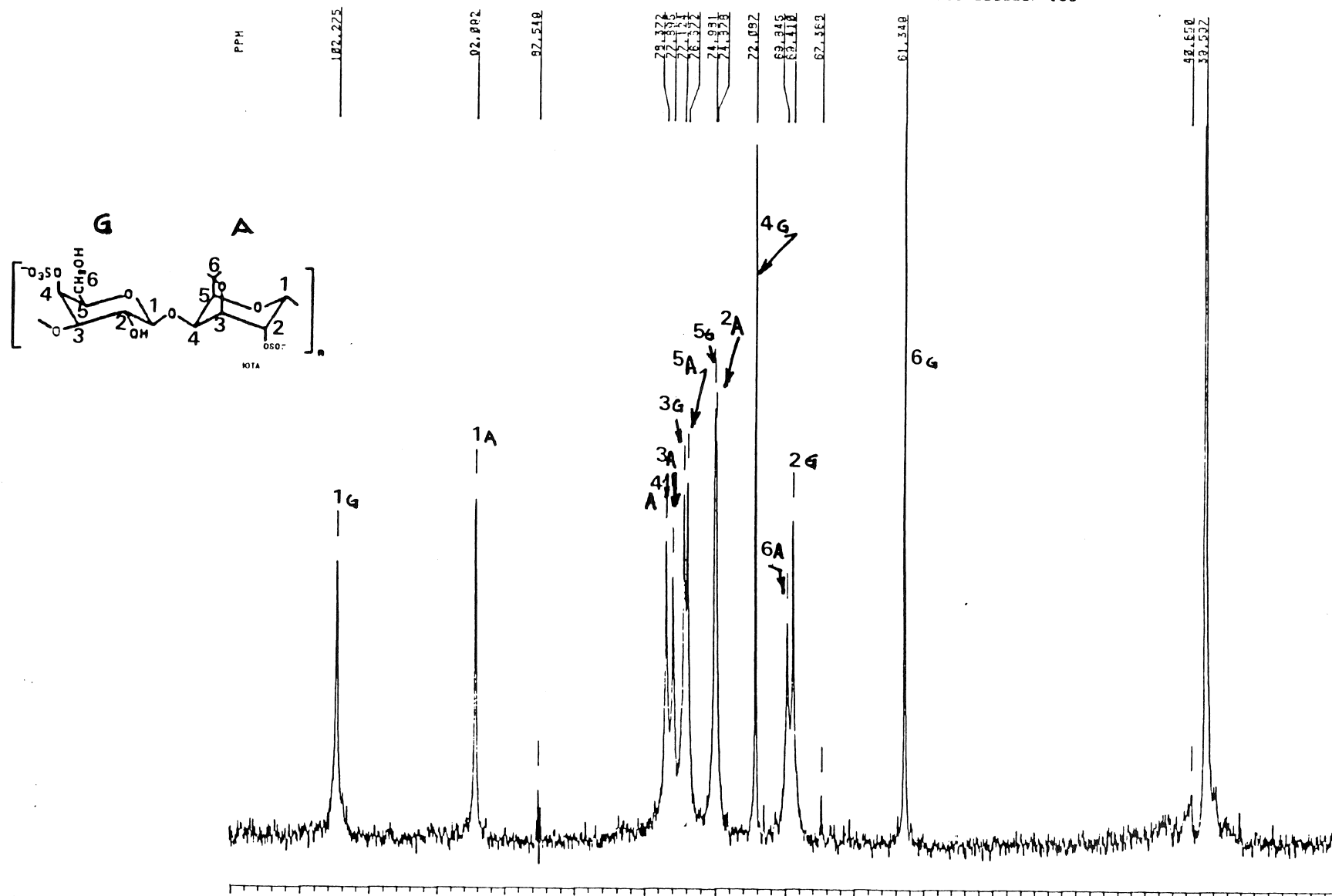


Figura 10 : Espectro de RMN- ^{13}C del carragenano con tratamiento alcalino de plantas estériles de *Eucheuma uncinatum* (BTA). Donde las señales de los carbonos de las unidades de iota-carragenano, $\beta\text{-D-Galactosa-4-sulfato}$ y 3,6-anhidro- $\alpha\text{-D-galactosa-2-sulfato}$, se denotan como N_G y N_A respectivamente.

IV.-DISCUSION :

Los resultados obtenidos en el presente estudio, confirman que los carragenanos que produce *E. uncinatum*, son del tipo iota. Entonces, las diferencias que se observan en diferentes trabajos sobre esta especie, pueden atribuirse al efecto de los factores ambientales (Dawes et al. 1977b; Correa-Díaz, 1987; Zertuche-González 1988; Soria-Mercado, 1992 y Zertuche-González et al., 1993), a diferentes porcentajes de hibridación de estructuras terminales y precursoras y/o a diferentes procedimientos de obtención.

IV.1.-Rendimiento de carragenanos:

En el presente trabajo el rendimiento de carragenanos, obtenido en base seca de *E. uncinatum* por precipitación con sales cuaternarias de amonio (cloruro de cetilpiridina), cae dentro del rango reportado en una variación estacional para ésta especie por Correa-Díaz (1987) de 32-42 % y Zertuche et al., (1993) de 31 a 48 % y los valores reportados por Dawes et al. (1977b) de 30.7 a 40.7 % para una variación geográfica por estadio de vida.

El rendimiento y composición química de los carragenanos se pueden ver influenciados por los pretratamientos aplicados a la materia prima, métodos de extracción y métodos de precipitación empleados. En este sentido, pretratamientos simples, tales como procesos sucesivos de secado-lavado-secado (aunque el lavado se realice con agua de mar), disminuyen considerablemente la proporción de sales del alga con un consiguiente incremento de la fracción orgánica de la misma (Larsen, 1978). Lo anterior se refleja en altos rendimientos de carragenanos en algas tratadas con este tipo de procedimientos. De la misma manera el proceso de despigmentación descrito por Craigie y Leigh (1978) elimina pigmentos, carbohidratos de bajo peso molecular y sales, donde este último componente puede representar más del 90 % del material extraído con los solventes (Knutsen y Grasdalen, 1987). Es por ello que el rendimiento reportado en base a algas despigmentadas es considerablemente mayor a los rendimientos obtenidos en base seca del alga original (Craigie y Leigh, 1978).

Los procesos de extracción que se emplean pueden influir en forma considerable con la composición de los carragenanos, por ejemplo pueden separarse carragenanos con composición diferente, efectuando extracciones selectivas mediante el uso de cationes (como potasio) que bajo ciertas condiciones, inhiben la solubilidad de algunos tipos de carragenanos que permanecen insolubles, mientras que fracciones con composición diferente, generalmente formas más sulfatadas son solubilizadas (por ejemplo la extracción selectiva propuesta por Stancioff, 1965). Algo similar se puede obtener mediante extracciones sucesivas a diferentes temperaturas (Goring y Young, 1955).

Respecto al método de precipitación empleado, el efecto que puede producir es aún mayor ya que una precipitación directa del material extraído en solución acuosa de las algas con solventes, coprecipita material soluble extraído junto con los carragenanos, principalmente almidón florideano, el cual de acuerdo a la especie y época del año puede representar altos porcentajes como fué determinado para *Furcellaria lumbricalis* por Knutsen y Grasdalen (1987). Esto conduce a sobreestimar los rendimientos y además afecta las determinaciones que se efectúen en el carragenano, ya que pueden estar considerablemente desviadas dependiendo de la proporción de material extraño presente.

La precipitación con bases cuaternarias de amonio como el cloruro de cetilpiridina ofrece ser un método más selectivo para precipitar polisacáridos sulfatados de los extractos algales, y permite la separación de material orgánico presente el cual permanece en solución (Craigie y Leigh, 1978).

IV.2.-Contenido de 3,6-anhidrogalactosa y grupos hemiéster sulfato:

Los resultados obtenidos para el carragenano nativo de *E. uncinatum* en las dos fases reproductivas analizadas en cuanto al contenido de 3,6-anhidrogalactosa (18.8 %) y ésteres de sulfato (35.4-36.4 %), son similares a los valores reportados para esta especie por Stancioff y Stanley (1969) para la fracción insoluble en KCl 3M, quienes encuentran un contenido de 3,6-AG y sulfatos de 18.8% y 34.9 % respectivamente. En forma similar, el contenido de anhidrogalactosa cae en el intervalo de valores reportados para esta especie cultivada en condiciones naturales por Zertuche et al. (1993); mientras que el

contenido de sulfatos es ligeramente mayor al reportado por estos autores. Por otra parte, nuestros valores son en forma consistente de 3 a 4 % mayores a los reportados para esta especie por Dawes et al., (1977b), ésto posiblemente se debe a que estos autores precipitaron directamente con solventes interfiriendo de esta manera la presencia de otros componentes orgánicos en el carragenano tal como fué mencionado anteriormente.

En los carragenanos de *E. uncinatum* con tratamiento alcalino, mediante la conversión de la unidad (1-4)-galactosa-6-sulfato a la correspondiente 3,6-anhidrogalaactosa (Anderson et al., 1968), se logra un incremento de aproximadamente 11 % en el contenido de este componente, pero el contenido de sulfatos solo tiene un decremento de 2 a 3%. Algo similar fué reportado por Stancioff y Stanley (1969) donde el tratamiento alcalino de la fracción soluble en KCl 3M incrementa en 22 % el contenido de anhidrogalaactosa con solo un decremento de 2.1 % en el contenido de sulfatos. Por su parte Smidsrod et al. (1967) no encuentran una relación estequiométrica entre la conversión de 3,6 anhidrogalaactosa y la eliminación de sulfatos con el tratamiento alcalino.

Santos (1989) reporta para los carragenanos de *E. uncinatum* extraídos en condiciones alcalinas un contenido de sulfatos de 34%, el cual es cercano al obtenido en el presente trabajo (33.25 %). Estos valores a su vez son de 4 a 5 % mayores a los reportados por Dawes et al. (1977b). Respecto al contenido de 3,6-anhidrogalaactosa para el carragenano con tratamiento alcalino, los valores obtenidos (30.34 - 31.50 %), son mayores al reportado por los mismos autores de 23 y 22 % respectivamente, las diferencias observadas pueden ser debidas al método de obtención empleado o bien a las variaciones naturales de la especie.

Stancioff y Stanley (1969) reportan para el carragenano de *E. spinosum* un contenido de sulfatos similar al lambda carragenano pero con un contenido de 3,6-anhidrogalaactosa similar al kappa carragenano. En el presente trabajo se obtiene un comportamiento similar en el carragenano con tratamiento alcalino de *E. uncinatum*, el cual presenta un contenido de 3,6-anhidrogalaactosa cercano al kappa carragenano pero con un porcentaje de sulfatación mucho mayor; mientras que comparando con iota carragenano comercial el contenido de sulfatos es cercano a éste pero con un porcentaje de anhidrogalaactosa ligeramente mayor (Tabla 3).

IV.3.-Razón molar Galactosa: Anhidrogalaactosa: Sulfatos:

La relación molar entre los componentes de carragenanos ya sea en referencia a la galactosa o bien referido por hexosa pueden ser un medio comparativo que facilite la identificación del tipo de carragenano que se estudie. En particular, la relación molar por hexosa es más fácil de visualizar y puede dar una idea más precisa de que tan cercana es la estructura respecto a la carrabiosa ideal correspondiente (Dawes et al., 1977b).

La razón molar de los componentes encontrada para el carragenano nativo en ambos estadíos reproductivos, de *E. uncinatum*, se encuentra desviada de la razón molar teórica por hexosa, correspondiente al iota carragenano ideal de 0.50/0.50/1.00. Con el tratamiento alcalino hay un acercamiento a la razón molar del iota carragenano comercial y a la correspondiente del iota carragenano ideal (tablas 3, 4a y 4b).

Por otra parte, los resultados obtenidos para el carragenano nativo muestran un patrón de sulfatación mayor al reportado por Lawson et al. (1973) pero caen dentro del intervalo (1.05-1.14 SO₄ por Hexosa) reportado por Dawes et al. (1977b) para el carragenano nativo de esta especie. Posterior al tratamiento alcalino la razón molar 3,6-AG/Gal obtenida de 0.94-1.02 es cercana a la reportada (0.95) por los primeros autores y mayor a la encontrada por Dawes op. cit.. De manera similar, los valores obtenidos de sulfatos por hexosa, se acercan más al iota carragenano ideal que los valores reportados por estos últimos autores. Las diferencias, como se mencionó anteriormente, pueden atribuirse a la presencia de material extraño (ej. almidón florideano entre otros) o a variaciones naturales de la especie.

Dado que en el carragenano con tratamiento alcalino, la razón molar de 3,6-anhidrogalaactosa corresponde a la razón molar teórica del iota carragenano (Tabla 4b), entonces, el desvío observado en el contenido de sulfatos puede ser debido, entre otros factores, a una sulfatación incompleta del C2 de la 3,6-anhidrogalaactosa y/o del C4 de la (1-3)-galactosa (Penman y Rees, 1973; Dawes et al., (1977a).

La razón molar obtenida para los carragenanos comerciales kappa e iota de 0.55/0.45/0.57 y de 0.55/0.45/1.00 respectivamente, muestran poca variación respecto a las razones molares teóricas (Kappa = 0.50/0.50/0.50, Iota = 0.5/0.5/1.0) (tablas 4a y 4b).

La razón molar determinada para el lambda carragenano comercial, es congruente con los valores teóricos para el mismo que van de 1.0/0/1.0 a 1.0/0/1.5 dependiendo de la presencia de 2 o 3 grupos sulfato por dímero, entonces la razón molar por hexosa de 0.89:0.11:1.26 corresponde a más de 2, pero menos de 3 grupos sulfato por dímero. (tablas 4a y 4b).

IV.4.-Carbohidratos reductores totales:

Los resultados obtenidos respecto a la estimación de carbohidratos reductores totales por la técnica de Dubois et al. (1956) muestran una gran variación entre los diferentes carragenanos y respecto a los estándares, de acuerdo a las equivalencias mostradas en la tabla 5, la respuesta en gran medida puede asociarse al grado de sulfatación, donde las formas más sulfatadas A nat y B nat se encuentran entre los carragenanos tipo iota y lambda y los menos sulfatados AAT y BAT entre las correspondientes al iota y kappa carragenano. Craigie y Leigh (1978) mencionan que la respuesta de la prueba depende del tipo de carragenano ya que puede estar influenciada por los diferentes niveles de grupos sulfato y 3,6-anhidrogalaactosa. Smidsrod et al. (1967) en coincidencia con lo anterior mencionan que la respuesta de la prueba depende en gran medida de la composición del carragenano y encuentran para carragenanos de *Chondrus crispus*, *Gigartina stellata* y *G. skottsbergii* a una densidad óptica de 0.1 a 485 nm una equivalencia de 12.4, 11.8 y 12.8 µg/ml respectivamente. Entonces la aplicación de la técnica de fenol-ácido sulfúrico, para cuantificar el contenido de carbohidratos reductores totales en carragenanos, debe implicar la elección de un estándar adecuado.

IV.5.-Viscosidad intrínseca:

La viscosidad es una propiedad física que depende de la composición química; básicamente del contenido de grupos hemiéster sulfato y de 3,6-anhidrogalaactosa.

El primero imparte propiedades hidrofílicas por lo que un alto contenido de éste componente se asocia a viscosidades altas. Lo opuesto corresponde a la 3,6-

anhidrogallactosa, la cual posee un carácter más hidrofóbico, por lo que un incremento de éste componente reduce la viscosidad de las soluciones (Smidsrod et. al., 1967).

Por otra parte, la viscosidad intrínseca es una medida que permite caracterizar a los polisacáridos ya que está asociada a la estructura molecular (composición, conformación y tamaño). En tal sentido, carragenanos estructuralmente diferentes poseerán viscosidades características para cada tipo de carragenano (Craigie y Leigh, 1978; Marrs, 1985).

Craigie y Leigh (1978) reportan que la viscosidad intrínseca para carragenanos se encuentra entre los intervalos de 20 a 22, 8 a 11 y de 6 a 8 ml/gr para carragenanos λ , κ e ι respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no coinciden con los valores anteriores, posiblemente debido a diferencias en el viscosímetro empleado, ya que se utilizó un viscosímetro con una razón de flujo muy pequeña (de 31 ± 1 seg) en lugar de flujo de 100 seg como es recomendable para obtener medidas más precisas (Craigie y Leigh op cit.).

Por otra parte, el empleo de carragenanos comerciales permite hacer una comparación y observar tendencias de comportamiento. Los resultados obtenidos muestran que el comportamiento de la viscosidad se puede correlacionar con el grado de sulfatación de los diferentes carragenanos donde; el carragenano lambda con mayor nivel de sulfatación presenta las viscosidades mayores; el carragenano kappa con menor contenido de sulfatos presenta las menores y el carragenano iota se encuentra en una posición intermedia entre los anteriores (5.65, 2.46 y 4.11 ml/g respectivamente) (Tabla 6).

De los resultados obtenidos, solo el carragenano de la muestra estéril de *E. uncinatum* con tratamiento alcalino BAT presentó un valor (464 ml/g) cercano al iota (411 ml/g). Este valor fué mayor al reportado por Rochas et al. (1989) de 308 ml/g para la fracción soluble en KCl de *E. cottonii* (predominantemente tipo iota).

Las diferencias en viscosidad intrínseca que presentan los carragenanos de *E. uncinatum*, además de otros factores, pueden atribuirse a diferencias en peso molecular (Goring y Young, 1955; Dawes et al., 1977a,b; Marrs, 1985). Marrs (1985) correlaciona la viscosidad intrínseca con el peso molecular de iota carragenano, de esta manera el

carragenano BAT con una viscosidad de 464 ml/g y AAT con 281 ml/g corresponden a iota carragenano con un peso molecular cercano a 319,000 y de 200,000 Daltons respectivamente.

La viscosidad intrínseca se relaciona directamente a la masa molecular por medio de la ecuación de Mark-Houwink $[\eta] = K \cdot M_w^a$ y con la rigidez de cadena. En este sentido y de acuerdo a la temperatura conformacional de 35 °C reportada para el iota carragenano en NaCl 0.1 M (Morris y Norton, 1983) a temperaturas de 25 °C la conformación de los carragenanos en solución adopta una forma ordenada de doble hélice (duplicado de la masa molecular). Entonces, de acuerdo a las viscosidades obtenidas (muestras con tratamiento alcalino son aproximadamente el doble, respecto a las nativas), las muestras con tratamiento alcalino ATA y BTA adoptan una forma más ordenada mientras que el carragenano sin tratamiento alcalino permanece en estado desordenado (cadenas sencillas). (Tabla 6).

IV.6.-Fuerza de Gel:

El carragenano nativo de *E.uncinatum* no formó gel pero después del tratamiento alcalino si poseé poder gelificante; algo similar fué reportado por Dawes et al. (1977b) para ésta especie, quienes encontraron que el carragenano nativo no gelificó pero el obtenido en condiciones alcalinas presentó una fuerza de gel de 490 gr/cm² a una concentración del 1.5 %. Santos (1989) encuentra para los carragenanos de ésta especie obtenidos en condiciones alcalinas una fuerza de gel de 84 gr/cm² a una concentración del 2 %. Stancioff y Stanley (1969) por su parte, reportan para *E. spinosum*, especie con características similares a *E.uncinatum*, una fuerza de gel de 35 gr/cm² a concentración de 1% en KCl 1 %. Los valores anteriores, permiten observar la gran variación que puede ocurrir dentro de esta especie y entre especies afines, aunque no se descartan también diferencias debidas a los métodos de obtención y medición empleados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo para los carragenanos con tratamiento alcalino de *E. uncinatum* concuerdan con los reportados para el tipo iota carragenano, ya que se observó una mayor afinidad hacia el calcio con la consecuente

formación de un gel más firme, elástico y transparente, al correspondiente gel formado con sales de potasio (Stancioff y Stanley 1969; Morris y Belton, 1980; Glicksman, 1982). La incapacidad de formar gel del carragenano nativo, por otra parte, puede atribuirse a la interrupción en la estructura de la cadena del iota carragenano por segmentos de la estructura precursora (v) más sulfatada.

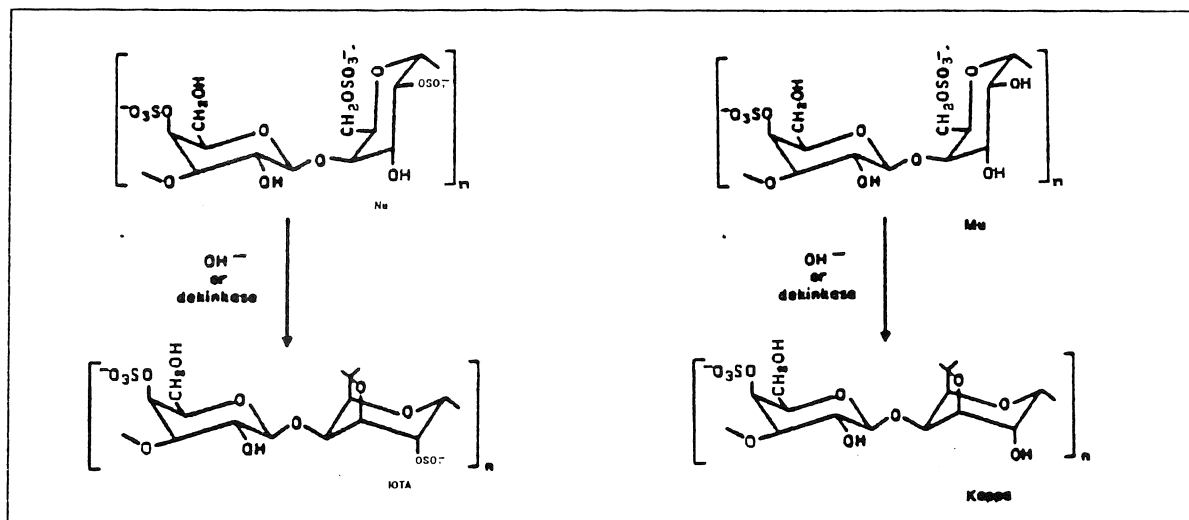
Las especies de carragenanos gelificantes (kappa e iota) a concentraciones suficientemente elevadas, pueden ser inducidas a adoptar una conformación ordenada, acompañada por la formación de gel, ya sea por la disminución de la temperatura y/o la adición de sales a la solución (Rees et al., 1982). Sin embargo, estos dos tipos de carragenanos, presentan diferencias en el ordenamiento conformacional lo cual explica las diferencias en propiedades mecánicas entre ambos tipos de galactanos sulfatados (Morris et al., 1980a). El kappa carragenano muestra una alta selectividad a cationes como potasio, rubidio y cesio (Smidsrod y Grasdalen, 1982 cit. por Piculell et al., 1992). El enlace del kappa carragenano con cationes induce a la formación de hélices y ocurre gelificación a muy bajas concentraciones (Rochas y Rinaudo, 1980; Morris et al., 1980b). La gelificación del kappa carragenano implica un extenso agregado de dobles hélices (Rees et al., 1969a,b y 1982) indicado por la pronunciada histéresis térmica en la transición conformacional. Como consecuencia, los geles de kappa carragenano, tienden a ser fuertes, quebradizos y opacos (Piculell et al., 1992).

En el caso del iota carragenano puro, la transición conformacional solamente es sensitiva a la valencia de los contraiones y hay poca diferencia en la selectividad hacia cationes de la misma valencia (Robinson et al., 1980). La transición conformacional del iota carragenano no muestra histéresis térmica, lo cual indica que hay menos o no existen agregados interhelicoidales, en su lugar ocurre la formación de una red tridimensional, donde las dobles helices se asocian en estructuras ordenadas o “domains” (estructura donde las dobles helices interaccionan con diferentes cadenas, lo cual explica las propiedades elásticas del iota carragenano). Este ordenamiento, se logra con el incremento de iones que inducen a la gelificación (ej. potasio, Morris et al., 1980a). Los geles de iota carragenano, son típicamente claros y mucho más débiles que los geles de kappa carragenano.

Por otra parte se ha encontrado que generalmente el iota carragenano (independientemente de la fuente) contiene pequeñas fracciones de kappa carragenano como impurezas (Bellion et al., 1981), en investigaciones recientes, se ha demostrado que la selectividad hacia cationes que muestra el iota carragenano se debe básicamente a estas impurezas y por lo tanto sus propiedades mecánicas están influenciadas por las mismas, tal como lo demuestra Piculell et al. (1992).

En el carragenano tipo lambda, el sulfato presente en el carbón 2 (C2) de la unidad (1-3)- β -D-galactosa (aunado a la ausencia del puente anhidro en la mayoría de los residuos unidos en (1-4)), actúa como un borde que impide adoptar una conformación ordenada helicoidal por lo que no forma gel; mientras que en el tipo iota, el sulfato en el C2 de la unidad (1-4)-3,6 α -D-anhidrogalactosa (3,6-AG) y el sulfato en C4 presente en iota y Kappa carragenano, se proyectan hacia afuera de la molécula y no interfieren estéricamente con la formación de la doble hélice por lo que estos carragenanos tienen la capacidad de gelificar. Por otra parte, en los carragenanos precursores mú y nú (fig. 11) la presencia de sulfatos en el C6 de la unidad (1-4)- α -D-galactosa, forma un rizo en la cadena que inhibe la formación de la doble hélice (Guisseley et al., 1980).

Figura 11.- Conformación de las unidades repetitivas de nú, mú, iota y kappa carragenano. (Tomado de Guiseley et al., 1980).



Carragenanos del tipo kappa forman geles fuertes y rígidos, con el incremento de sulfato en el C2 de la 3,6-AG hay una disminución progresiva de la fuerza de gel hasta el punto en que la mitad de la 3,6-AG está sulfatada y los geles que forma son débiles y quebradizos. A partir de ese punto ocurre un incremento gradual hasta que prácticamente toda la anhidrogalactosa se encuentra sulfatada (iota carragenano) y forma geles elásticos similares a la gelatina que no presentan sinéresis (Guiseley et al., 1980; Stancioff y Stanley 1969; Stanley 1987).

IV.7.- Espectros de Infrarojo:

Los espectros de infrarojo del carragenano nativo y con tratamiento alcalino de *E. uncinatum* presenta en la región de diagnóstico (800 a 940 cm^{-1}) el triplete de picos asociados al iota-carragenano: el pico a 805 cm^{-1} asignado a la 3,6-anhidrogalactosa 2-S (Anderson et al., 1968b); la banda a $845\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ atribuida a las vibraciones de estiramiento del S=O de la (1-3)- β -D-galactosa 4S (Lloyd y Dodgson, 1961, cit. por Stancioff y Stanley, 1969) y la banda a 930 cm^{-1} correspondiente a la 3,6-anhidrogalactosa (Stanley, 1963). Esta misma banda Rochas et al., (1986) la atribuyen a la señal de la 3,6-anhidrogalactosa con contribución de la β -D-galactosa 4-S (Fig).

Por otra parte, los espectros obtenidos son similares a los reportados para ésta especie por Dawes et al. (1977b) y el carragenano insoluble y soluble con tratamiento alcalino fraccionado en 3M de KCl (EU₁ y EU_{2A1} respectivamente) reportados por Stancioff y Stanley (1969), así como a los espectros de carragenano nativo reportados por Correa-Díaz (1987); Zertuche-González (1988) y Vega-Castro y Martínez-Rocha (1989). De igual manera los espectros de *E. uncinatum*, muestran similitud a los obtenidos para de *E. spinosum* reportado por Bellion et al. (1983) y Whyte et al. (1985); así como a las diferentes especies de *Eucheuma* de Florida productoras de iota-carragenano, (Dawes et al., 1977a).

El tratamiento alcalino elimina el grupo sulfato presente en el C6 de la (1-4)- α -D-galactosa 6-sulfato (o 2,6-disulfato) con la consiguiente formación de 3,6-anhidrogalactosa (o anhidrogalactosa 2-sulfato) (Anderson et al., 1968b) y su efecto

puede ser observado por la disminución de la banda a 1250 cm^{-1} correspondiente al total de sulfatos. Como consecuencia, ocurre un decremento de la absorción en la región de $1000\text{ a }980\text{ cm}^{-1}$ que provoca una mejor definición de la estructura en doblete formada por las bandas a $970\text{ y }930\text{ cm}^{-1}$ (Dawes et al., 1977a y b; Correa-Díaz, 1987). En forma similar, el decremento en la absorción en la región de 820 cm^{-1} , correspondiente al éster sulfato del C6 de la unidad α -D-galactosa, donde no se manifiestan picos definidos, provoca un incremento aparente de las bandas de absorción a $805\text{ y }845\text{ cm}^{-1}$ tal como fué mencionado por Stancioff y Stanley (1969) (Figs. 6).

De igual manera, los espectros obtenidos del iota-carragenano comercial presentan las mismas bandas que el carragenano nativo y del carragenano con tratamiento alcalino de *E. uncinatum*, pero la similitud respecto a la intensidad de las bandas es mayor con estos últimos.

Respecto al lambda carragenano comercial el espectro de IR obtenido es similar al descrito por Stancioff y Stanley (1969) para la fracción lambda de *Gigartina stellata*.

La señal débil a 900 cm^{-1} asignada a (1-3) galactosa desulfatada en agar (Whyte et al. 1985) al híbrido β/κ carragenano (Whyte et. al. 1985; Knutsen y Grasdalen, 1987; Santos, 1989; Liao et al. 1993) y α -carragenano (Zabackis y Santos, 1986) se presenta con mayor o menor intensidad en todos los espectros analizados incluso en lambda carragenano lo cual soporta la idea de la presencia de residuos de galactosa enlazados en 3 y /o 4 sin sulfatar, tal como lo menciona Chiovitti et al. (1995a). Esto contribuye a la desviación observada en el patrón de sulfatación del carragenano respecto de las estructuras ideales .

Para propósitos cuantitativos es difícil precisar, mediante una comparación simple, cuando ocurre un cambio de intensidad de las señales entre un espectro y otro, ya que por un lado la disminución de sulfatos por el tratamiento alcalino disminuye la absorción en ciertas regiones del espectro con el consiguiente incremento de otras. Esto deja al descubierto algunas bandas de absorción antes no visibles (ej 970 cm^{-1}). Además de lo anterior, existen otros factores que también influyen la intensidad de las bandas de absorción, como son la concentración y la respuesta instrumental. Sin embargo, el empleo de razones entre bandas de absorción puede emplearse comparativamente entre diferentes

espectros y hacer más visibles las diferencias (Stancioff y Stanley, 1969; Peats, 1981; Rochas et al., 1986 y Cosson et al., 1995).

El empleo de las razones antes mencionadas requiere de cierta estandarización en la metodología y en lo posible el empleo de curvas de calibración propias. En lo que respecta a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró una mayor correlación de las moles de sulfato por hexosa con la razón a 805/845 propuesta por Peats (1981) y con la razón 805/2920 propuesta por Rochas et al. (1986).

Algo notable que se observó, fué que la correlación entre las razones anteriores con el grado de sulfatación, fué mayor cuando se empleó en el cálculo la absorción total de las bandas en vez de la absorción determinada por la línea base más probable empleada por Rochas et al. (1986). Empleando el mismo método de cálculo la razón 805/845 fué casi equivalente a la razón 805/970 tal como fué observado por Correa-Díaz et al. (1990) con el método de Rochas op. cit..

Mediante la comparación de las razones de absorción a 805/2920, 930/2920 y la de 805/845 se puede observar el efecto del tratamiento alcalino sobre los carragenanos. El incremento de las primeras dos razones lleva a suponer que la desulfatación de las unidades disacáridas, forma en primer instancia la correspondiente 3,6-AG-2-S como componente principal en los carragenanos de *E. uncinatum* y en menor grado a 3,6-AG desulfatada, lo cual es congruente con el menor grado de sulfatación estimado mediante la razón molar (Tabla 8).

IV.8.-Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN-C13).

Todas las señales obtenidas en los espectros de los carragenanos de *E. uncinatum*, en los diferentes estadios y tratamientos mostraron una diferencia constante de 0.3 a 0.4 ppm respecto a los obtenidos por Bellion et al., 1983, lo cual puede deberse al método de referencia empleado (Craigie, 1997).

El espectro de RMN C-13 obtenido de *E. uncinatum* es similar al reportado para *E. spinosum* por Bhattacharjee et al. (1977 y 1978); Bellion et al. (1981); Bellion et al. (1983) y Deslandes et al. (1990).

El espectro del carragenano con tratamiento alcalino de *E.uncinatum* presentó las 12 señales mayores características del iota carragenano (A_{TA} y B_{TA} de figs. 8 y 10) y en la región de los carbonos anoméricos solo se observan las señales características de la unidad disacárida repetitiva (G4-A2) del iota carragenano I_{G1} (102.2 ppm) e I_{A1} (92.1 ppm), Bhattacharjee et al. (1977 y 1978); Bellion et al., (1983); Usov et al., (1980); Usov (1984); Greer y Yaphe (1984b).

En el espectro del carragenano con tratamiento alcalino donde no se eliminó el almidón florideano (A_2 de la fig.9), presentó una serie de señales adicionales que están ausentes en los carragenanos precipitados con cetavión. Estas señales coinciden con las señales correspondientes a los carbonos de α -D-glucanas reportadas por Dais et al. (1982) y con las señales obtenidas de la fracción soluble en cetavión de *Furcellaria lumbricalis* por Knutsen y Grasdalen (1987). En el mismo espectro, a pesar del traslape de las señales de algunos carbonos del almidón florideano con los respectivos de carragenanos, este no interfiere en la identificación del tipo de carragenano presente ya que en la región de los carbonos anoméricos, el carbón anomérico para α -D-glucanas se localiza en un campo ligeramente mayor al correspondiente a cualquier tipo de carragenanos (señal a 100.2 ppm., Dais et al., 1982; Knutsen y Grasdalen, 1987).

El espectro de RMN- C^{13} del carragenano nativo de *E.uncinatum* ($Anat$) muestra algunas señales que están ausentes en el carragenano con tratamiento alcalino. Particularmente en la región de los carbonos anoméricos se presentan dos señales de menor intensidad respecto a las identificadas para el iota carragenano, éstas son las señales asignadas al G1 y D1 (a 104.91 y 98.46 ppm respectivamente), de la unidad repetitiva G4S-D2S,6S (v -carragenano), precursora de ι -carragenano (Bellion, 1983; Bellion et al., 1983 y Greer y Yaphe, 1984b) (fig 7).

La resonancia magnética nuclear de C^{13} ha probado ser una técnica útil en la identificación de carragenanos híbridos, principalmente por las señales emitidas por los carbonos anoméricos. Es por ello que en el carragenano de *E. uncinatum* la ausencia de otras señales en este campo, diferentes a las del iota carragenano, descartan la presencia como componente mayor de otro tipo de carragenanos (ej. kappa, beta etc.). A pesar de lo anterior, no debe descartarse que puedan estar presentes como componentes menores y

su concentración esté por abajo del límite de detección, tal como fué observado en los espectros de RMN-C13 de la fracción resistente a la enzima ι -carragenasa de *E. spinosum*, (Bellion et al., 1981; Bellion, 1983) y de *E. nudum*, (Greer y Yaphe, 1984b).

IV.9.- Prueba de Bondad de Ajuste:

El manejo estadístico de los datos obtenidos por la ruta no paramétrica y en este caso por la prueba χ^2 nos permite hacer comparaciones entre las muestras y con estándares, la prueba, indica que los carragenanos nativos tienen similitud con el tipo iota.

Los carragenanos con tratamiento alcalino muestran similitud con kappa carragenano, pero la semejanza es mayor con los del tipo iota (tabla 12).

Con base en lo discutido en el presente trabajo, puede afirmarse que *Eucheuma uncinatum* contiene carragenanos del tipo iota como componente principal. Las características fisicoquímicas, así como la composición química típicas para iota carragenano, no se manifiestan en el carragenano nativo, solo se presentan posterior a un tratamiento alcalino. Esto quiere decir que la forma precursora ν carragenano se encuentra presente en el carragenano nativo en cantidad suficiente para enmascarar el carácter del iota carragenano.

Las diferencias que mostró el carragenano de *E. uncinatum* en la fuerza de gel respecto al iota carragenano comercial, la desviación en el patrón de sulfatación respecto a la estructura idealizada, así como el incremento de la señal correspondiente a la 3,6-anhidrogalactosa en los espectros de infrarojo con tratamiento alcalino, son indicativos de la presencia de pequeñas fracciones de kappa carragenano, por este motivo, la aplicación de enzimas puede ser una herramienta útil para su detección.

V.- BIBLIOGRAFIA:

Alvarez-Colsa, P., (1993). Extracción y análisis de los carragenanos de *Gigartina pectinata* Dawson (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada con fertilizantes agrícolas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Marinas, UABC. Ensenada, Baja Cfa. México. pero los datos muestran mayor similitud de este último con

Anderson, N.S, T.C.S. Dolan y D.A. Rees, (1968). **Carrageenans: III.** Oxidative hidrólisis of methylated κ -carrageenan and evidence for a masked repeating structure. *J. Chem. Soc. (C)*: 596-601.

Anderson, N.S, T.C.S. Dolan, A. Penman, D.A. Rees, G. P. Mueller, D. J. Stancioff and N. F. Stanley, (1968). **Carrageenans: IV.** Variations in the structure and gel properties of κ -carrageenan, and the characterisation of sulphate esters by infrared spectroscopy. *J. Chem. Soc. (C)*: 602-606.

Anderson, N.S, T.C.S. Dolan, C.J. Lawson, A. Penman y D.A. Rees, (1968). **Carrageenans: V.** The masked repeating structures of Lambda and Mu-carrageenans. *Carbohydr. Res.*, 7, 468.

Anderson, N.S, T.C.S. Dolan y D.A. Rees, (1973). **Carrageenans: VII.** Polysaccharides from *Eucheuma spinosum* and *Eucheuma cottonii*. The covalent structure of ι -carrageenan. *J. Chem. Soc.(I)*: 2173-2176.

Bellion, C., G. K Hamer y W. Yaphe., (1981). Analysis of Kappa-Iota hybrid carrageenans with Kappa-carrageenase, Iota-carrageenase and ^{13}C NMR. In: Proc.Int. Seaweed Symp., 10, 379-384.

Bodeau-Bellion C., (1983). Analysis of carrageenan structure. *Physiologie Végétale*, vol. 21:785-793.

Bellion, C., G. Brigand, J.C. Prome, D. Welti y S. Bociek; (1983). Identification et caractérisation des précurseurs biologiques des carraghénanes par spectroscopie de R.M.N. ^{13}C . *Carbohydrate Research*, 119, 31-48.

Bixler, Harris J., (1996). Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*, 326/327: 35-57

Bhattacharjee, S. S., W. Yaphe y G. K. Hamer, (1978). Carbon ^{13}C N.M.R. spectroscopic analysis of agar, κ -carrageenan and ι -carrageenan. *Carbohydrate Research*, 60: 1-3.

Bhattacharjee, S. S., W. Yaphe y G. K. Hamer; (1977). Study of agar and carrageenan by ^{13}C Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *International seaweed symp* .9: 379-385 .

Black, W. A. P., W. R. Blakemore, J. A. Colquhoun y E.T. Dewar, (1965). The evaluation of some red marine algae as a source of carrageenan and of its κ - and λ -components. *J. Sci. Fd. Agric.*, **16**:573-585.

Chapman V. J. y Chapman D. G., (1980). *Seaweeds and their uses*. 2da. ed. London: Chapman and Hall.

Chiovitti, A., M. L. Liao, G. T. Kraft, S. L. A. Munro, D. J. Craik y A. Bacic; (1995a). Cell wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Iota/kappa/betta carrageenans from *Melanema dumosum*. *Phycologia* **34**:522-527.

Chiovitti, A., M. L. Liao, G. T. Kraft, S. L. A. Munro, D. J. Craik y A. Bacic; (1995b). Cell wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): Highly methylated carrageenans from the genus *Rhabdonia*. *Botanica Marina*, **39**, 47-59.

Cosson, J., E. Deslandes, M. Zinoun y A. Mouradi-Givernaud, (1995). Carrageenans and agars, red algal polysaccharides. En: **Progress in Phycological Research**, Vol. **11**; Eds. Round, F. E. y D. J. Chapman, Biopress Ltd.

Correa Díaz, F., (1987). Variación estacional del rendimiento de carragenano extraído de *E. uncinatum*, Setchell y Gardner (Rhodophyta) de Bahía de los Angeles, B.C., Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias Marinas, U.A.B.C., Ensenada, B.C., pp. 35.

Correa-Diaz, F., R. Aguilar-Rosas y L. E. Aguilar-Rosas, (1990). Infrared analysis of eleven carrageenophytes from Baja California, México. *Hydrobiologia*, **204/205** : 609-614.

Craigie, J.S., (1990). Cell walls. In: *Biology of red Algae*, (Cole, K.M. y Sheath, R. G. eds.), 221-257, Cambridge, Univ. Press, Cambridge y New York.

Craigie, J.S., (1997). Reporte: Resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN-C13) de los carragenanos de *Eucheuma uncinatum*. Para: Dr. José A. Zertuche G. y Enrique Hernández G.

Craigie, J.S. y C. Leigh; (1978). Carrageenans and agars. In: **Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods**. (J. Hellebust y J.S. Craigie, eds). pp. 110-131. Cambridge, Univ. Press, Cambridge y New York.

Craigie, J.S. y Z. C. Wen; (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. y K. F. Wong; (1979). Carrageenan biosynthesis. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **9**: 369-377.

Dais, P. y A. S. Perlin; (1982). High-field ^{13}C -N.M.R. spectroscopy of β -D-glucans, amylopectin and glycogen. *Carbohydrate Research*, **100**:103-116.

Dawes, C. J., N. F. Stanley y D. J. Stancioff, (1977 a). Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry and i-carrageenan from floridean *Eucheuma* (Rhodophyta, Gigartinales), *Botanica Marina*, **20**:137-147.

Dawes, C. J., N. F. Stanley y R. E. Moon; (1977 b). Physiological and biochemical studies on the i-carrageenan producing red algae *Eucheuma uncinatum* Setchell and Gardner from the Gulf of California. *Botanica Marina*, **20**:437-442.

Deslandes E., Floc'h J. Y., Bodeau-Bellion C., Brault D. and Braud J. P., (1985). Evidence for ι -carrageenans in *S. chordalis* (Solieriaceae) and *C. jubata*, *C. ciliata*, *C. purpureum* (Rhodophyllidaceae). *Botanica Marina*, **38**: 317-318.

Deslandes E., Bodeau-Bellion C., Floc'h J. Y. y M. Penot, (1990). ^{13}C -NMR spectroscopy and chemical analysis of the carrageenans of four red algae (Gigartinales). *Plant. Physiol. Biochem.*, **28** (1): 65-69.

Dolan, T. C. S. y Rees, D. A. (1965). **The carrageenans**. Part II. The positions of the glycosidic linkages and sulfate esters in λ -carrageenan. *J. Chem. Soc.* 3534-3539.

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers y F. Smith, (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-355.

Glicksman, (1982). Carrageenan and Furcellaran en: **Food Hydrocolloids**. Vol.III. pp. 83-107. General Foods Corporation, Tarrytown, New York.

Gordon-Guist, G. (1989). Reporte FMC. Marine Colloids. Para: Dr. José Zertuche G. IIO, UABC.

Goring, D. A. I. y E. G. Young, (1955). Studies on carrageenin: Comparison of fractions obtained with potassium chloride and by successive extraction at elevated temperatures. *Canadian Journal of Chemistry*. Vol. **33**, 480-495.

Guiseley, K. B. , N. F. Stanley y P. A. Whitehouse, (1980). Carrageenan. En: **Handbook of Water-Soluble Gums**, Chap. 5 ed. por R. L. Davidson, McGraw-Hill, New York.

Greer, C. W. y W. Yaphe. (1984a). Characterization of hybrid (beta-kappa-gamma) carrageenan from *Eucheuma gelatinae* J. Agardh (Rhodophyta, Solieriaceae) using carrageenases, infrared and ^{13}C -Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Botanica Marina*, **27**:473-478.

- Greer, C. W. y W. Yaphe. (1984b). Hybrid (iota-nu-kappa) carrageenan from *Eucheuma nudum* (Rhodophyta, Solieriaceae), identified using iota and kappa-carrageenases and ¹³C-Nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Botanica Marina*, **27**:479-484.
- Haug, A. (1974). Chemistry and biochemistry of algal cell-wall polysaccharides. En: MTP *Int. Rev. Sci. Biochem. Ser. 1* vol **11**, *Plant Biochemistry*, ed. D. H. Northcote, pp. 51-88. London: Butterworths.
- Knutsen, S. H. y H. Grasdalen, (1987). Characterization of water-extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. *Botanica Marina*, **30** :497-505.
- Knutsen, S. H., D. E. Myslabodski, B. Larsen y A.I. Usov, (1994). A modified system of nomenclature for red algal galactans. *Botanica Marina*, **37** :163-169.
- Larsen B., (1978). Curso Evaluación química de los recursos algales de Baja California, Esc. Superior de Ciencias Marinas UABC. Ensenada Baja California, México.
- Lawson, C. J., Rees, D.A., Stancioff, D. J. y Stanley, N. F.; (1973). **Carrageenans**. Part VIII. Repeating structures of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardiella tenera*, *Pachymenia hymantophora* and *Gloiopeltis cervicornis*. *J. Chem.Soc.(Perkin Trans 1)*: 2177-2182.
- Liao, M. L. , G. T. Kraft, S. L. A. Munro, D. J. Craik y A. Bacic, (1993). Beta/Kappa-carrageenans as evidence for continued separation of the families Dicranemataceae and Sarcodiaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* **29** : 833-844.
- Marrs, W. M., (1985). Structural characterisation of carrageenans. En: **Gums & stabilisers for the food industry**. Ed. por : Glyn O. Phillips, David J. Wedlock y Peter A. Williams. Elsevier Applied Sciences Publishers, London & New York.
- McCandless , E. L. y J. S. Craigie, (1979). Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Ann. Rev. plant Physiol.* **30**: 41-53.
- McCandless, E. L., J. S. Craigie y J. A. Walter (1973). Carrageenans in the gametophytic and sporophytic stages of *Chondrus crispus*. *Planta* **112**: 201-212
- McCandless, E. L., J. S. Craigie y J. E. Hansen (1975). Carrageenans of gametangial and tetrasporangial stages of *Iridaea cordata* (Gigartinaceae). *Canadian J. Bot.* **53**: 2315-2318.
- McCandless, E. L., J. A. West y M. D. Guiry, (1982). Carrageenans patterns in the Phylloporaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **10**: 275-284.

McCandless, E. L., J. A. West y M. D. Guiry, (1983). Carrageenans patterns in the Gigartinaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **11**: 175-182.

Mollion, J.; (1980). Infrared and chemical studies of the carrageenan from *Anatheca montagnei* Schmitz, (Solieriaceae) from Senegal, West Africa. *Botanica Marina*, **23**:197-199.

Morris, E. R. e I. T. Norton, (1983). Polysaccharide Aggregation in Solution and Gels. En: **Aggregation Processes in Solution**. Ed. por Wyn-Jones, E y J. Gormally. Elsevier Amsterdam, pp. 549-593.

Morris, E. R., D. A. Rees y G. Robinson, (1980a). Cation-specific aggregation of carrageenan helices; domain models of polymer gel structure. *J. Mol. Biol.* **138**: 349-362.

Morris, E. R., D. A. Rees, G. Robinson y G. A. Young, (1980b). Competitive inhibition of interchain interactions in polysaccharide systems. *J. Mol. Biol.* **138**: 363-374.

Morris, V. J. y P. S. Belton, (1980). Specific ion effects in ι-carrageenate gels. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **777**. pp. 983-984.

Pacheco-Ruiz, I. Comunicación personal. Investigador Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC. Ensenada, B.C. México.

Painter, T. J.; (1983). Algal polysaccharides. En: **The Polysaccharides**, vol. 2, ed. G. O. Aspinall, pp. 195-285. New York: Academic.

Peats, S.; (1981). The infrared spectra of carrageenans extracted from various algae. *Proc. Int. Seaweed Symp.* **10**: 495-502.

Penman, A. y D. A. Rees, (1973). **Carrageenans**. Part IX. Methylation analysis of galactan sulphates from *Furcellaria fastigiata*, *Gigartina canaliculata*, *Gigartina chamissoi*, *Gigartina atropurpurea*, *Ahnfeltia durvillaei*, *Gymnogongrus furcellatus*, *Eucheuma cottonii*, *Eucheuma spinosum*, *Eucheuma isiforme*, *Eucheuma uncinatum*, *Aghardiella tenera*, *Pachymenia hymantophora* and *Gloiopeltis cervicornis*. Structure of ε-carrageenan. *J. Chem.Soc.(Perkin Trans 1)*: 2182-2187.

Pernas, A. J. , O. Smidsrod, B. Larsen y A. Haug (1967). Chemical heterogeneity of carrageenans as shown by fractional precipitation with potassium chloride. *Acta. Chem.Scand.* **21**: 98-110.

Piculell, L., S. Nilsson y P. Muhrbeck, (1992). Effects of small amounts of kappa-carrageenan on the rheology of aqueous iota-carrageenan. *Carbohydrate Polymers*, **18**: 199-208.

- Rees, D. A.; (1963). The carraggenan system of polysaccharides. I. The relation between the κ and λ -components. *J. Chem. Soc.*, pp. 1851-1832.
- Rees, D.A.; (1969a). Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **24**: 267-332.
- Rees, D. A.; (1969b). Conformational analysis of polysaccharides. II. Alternating copolymers of the agar-carrageenan-chondroitin type by model building in the computer with calculation of helical parameters. *J. Chem. Soc. B.* 217-226.
- Rees, D. A., E. R Morris, D. Thom y J. K. Madden, (1982). Shapes and interactions of carbohydrate chains. En: **Polysaccharides 1**. Ed. G. O. Aspinall. Academic Press. New York. pp. 195-290.
- Robinson, G., E. R. Morris y D. A. Rees, (1980). Role of the double helices in carrageenan gelation: The domain model. *J. C. S. Chem. Comm.*, 152-153.
- Rochas , C. y Heyraud, A. (1981). Acid and enzymic hydrolysis of kappa carrageenan. *Polymer Bull.*, **5** : 81-86.
- Rochas , C., M. Lahaye y W. Yaphe, (1986). Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Botanica Marina*, **29** : 335-340.
- Rochas , C. y M. Rinaudo, (1980). Activity coefficients of counterions and conformatio in kappa-carrageenan systems. *Biopolymers*, **Vol: 19**, 1675-1687.
- Rochas , C., M. Rinaudo y S. Landry, (1989). Relation between the molecular structure and mechanical properties of carrageenan gels. *Carbohydrate polymer*, **10**: 115-127.
- Santos, G.A.; (1989). Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). *Aquatic Botany*, **36**: 55-67.
- Smidsrod, o., Larsen, B., Pernas, A. J. y Haug, A.; (1967). The effect of alkali treatment on the chemical heterogeneity and physical properties of some carrageenans. *Acta Chem. Scand.* **21**: 2585-2598.
- Smith, D. B., A. N. O'Neill, y A. S. Perlin, (1955). Studies on the heterogeneity of carrageenin. *Can. J. of Chemistry*. Vol **33**: 1352-1360.
- Soria-Mercado, I. E.; (1992). Efecto de la temperatura del agua y la edad del tejido en el rendimiento y calidad de los carragenanos extraídos de *Eucheuma uncinatum* Setchell y Gardner (Rhodophyta Gigartinales). Tesis de Maestría, **Fac. de Ciencias Marinas, U.A.B.C.**, Ensenada Baja California, México.
- Stancioff, D. J., (1965). Patente E.U.A No. 3, 176,003

Stancioff, D. J., Stanley, N. F.; (1969). Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, **6**: 595-609.

Stanley, N. F.; (1963). Process for treating a polisaccharide of the Gigartinaceae and Solieriaceae families. *Patente E.U.A.* 3,094,517.

Stanley, N. F.; (1987). Production, properties and uses of carrageenan en: **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. Ed. por : D. J. McHugh. FAO Fisheries Technical paper N. 288.

Stevenson, T. T. y R. H. Furneaux, (1991). Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, **210**: 277-298.

Usov, A. I. ; (1984). NMR Spectroscopy of red seaweed polysaccharides; agars, carrageenans and xylans. *Botanica Marina*, **27**: 189-202.

Usov, A. I., S.V. Yarotsky y A. S. Shashkov; (1980). ¹³C-NMR spectroscopy of red algal galactans. *Biopolymers* **19**: 977-990.

Vega Castro, I. E. e I. A. Martínez Rocha; (1989). Cuantificación y caracterización de los carragenanos de *Eucheuma uncinatum* Setchell y Gardner (Rhodophyta, Gigartinales) cultivada en tanques bajo diferentes condiciones de luz y nutrientes. Tesis de Licenciatura. **Fac. de Ciencias Marinas, U.A.B.C.**, Ensenada Baja Cfa. México. pp.61.

Whyte, J. N. C., S. P. C. Hosford y J. R. Englar; (1985). Assingment of agar or carrageenan structures to red algal polysaccharides. *Carbohydrate Research* **140**: 336-341.

Yaphe, W. y Arsenault, G. P.; (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. *Analyt. Biochem.*, **13**: 143-148.

Zar, J. H., (1996). **Biostatistical Analysis**. 3er. ed. Prentice-Hall, Inglewood Cliffs, New Jersey. pp. 662.

Zablackis, E. y G. A. Santos, (1986). The carrageenan of *Catenella nipae* Zanard., a marine red alga. *Botanica Marina*, **29**: 319-322.

Zertuche González, J. A., (1988). In situ life history, growth and carrageenan characteristic of *Eucheuma uncinatum* (Setchell & Gardner) Dawson, from the Gulf of California. Ph. D. thesis. State University of New York, Stony Brook, New York.

Zertuche González, J. A., I. Pacheco Ruíz e I. E. Soria Mercado; (1993). Carrageenan yield and properties of *Eucheuma uncinatum* (Setch. and Gard.) Daw. cultured under natural conditions. *Hydrobiologia*, **260/261**: 601-605.