

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
ENSENADA, B.C.



EVALUACIÓN ESTACIONAL DEL RENDIMIENTO Y CALIDAD DE
LOS AGARES DE *Gracilariopsis lemaneiformis* (BORY) DAWSON,
ACLETO ET FOLDVIK 1964 DE BAHÍA DE LAS ANIMAS, B.C.,
MÉXICO.

TESIS QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE OCEANÓLOGO
PRESENTA

FAUSTO ARELLANO CARBAJAL

Ensenada, B.C.

Octubre de 1997

RESUMEN

Se estudió la variación estacional de los agares de *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory) Dawson, Acleto et Foldvik 1964 en Bahía de las Animas, Baja California, México; con muestras recolectadas entre mayo de 1995 y febrero de 1996. *Gracilariopsis lemaneiformis* exhibió una variación estacional en el rendimiento y calidad de sus agares. El rendimiento varió de un mínimo de 8.16 % en verano a un máximo de 15.37 % en otoño, el contenido de 3,6-anhidrogalactosa de 35.51 % en otoño a 47.82 % en invierno, el grado de sustitución por grupos sulfatos fluctuó de 0.76 % en invierno a 2.68 % en otoño. En general se observaron intervalos de histéresis altos, de 57 a 59° C. La fuerza de gel varió, en las muestras estacionales, de 216 g/cm² en otoño a 785 g/cm² en invierno. Se observaron diferencias en la fuerza de gel entre dos muestras de distinta coloración colectadas en la primavera de 1996 (mayo de 1996), después del ciclo estacional; las fuerzas encontradas fueron de 891 g/cm² para la muestra roja-oscura contra 307 g/cm² para la muestra roja-verde.

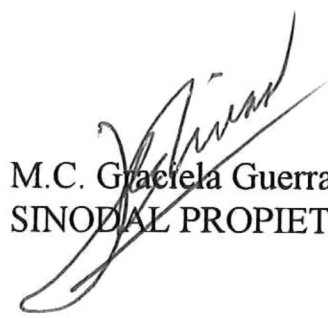
EVALUACIÓN ESTACIONAL DEL RENDIMIENTO Y LA CALIDAD
DE LOS AGARES DE *Gracilariopsis lemaneiformis* (BORY) DAWSON,
ACLETO ET FOLDVIK 1964 DE BAHÍA DE LAS ANIMAS, B.C.,
MÉXICO.

TESIS
que para obtener el Título de
OCEANÓLOGO
Presenta

Fausto Arellano Carbajal

Aprobada por:


M.C. Felipe Correa Díaz
PRESIDENTE DEL JURADO


M.C. Graciela Guerra Rivas
SINODAL PROPIETARIO


Oc. Raúl Aguilar Rosas
SINODAL PROPIETARIO

DEDICATORIA

A mis padres:

Ana Joaquina Carbajal y Fausto Arellano

Por ser mi ancla y vela mayor en este gran océano que es la vida.

A mis hermanos:

Fernando y Fabricio

Por su cariño y amistad que siempre nos ha mantenido juntos a pesar de las distancias.

A toda mi familia:

Por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Felipe Correa Díaz, director de este trabajo, por su apoyo, paciencia y amistad.

A la M.C. Graciela Guerra Rivas y al Oc. Raúl Aguilar Rosas por su tiempo, sus acertados comentarios y sus sugerencias en la elaboración de esta tesis.

Al M.C. Isaí Pacheco y su grupo de trabajo por el aporte de las muestras.

A Mauricio López por la ayuda brindada en la impresión de este trabajo.

Al Oc. Gerardo Martínez por contarme acerca de la carrera de oceanólogo.

A mi tía Rosa Cortés por su visión y por la comida que cambió el rumbo de mi vida.

Al Dr. Eduardo Santamaría del Angel y su familia, por el apoyo brindado a mi llegada y durante el resto de la carrera, por sus buenos consejos y su amistad.

A todos los maestros de la Facultad de Ciencias Marinas, en especial a Toño Martínez por despertarme el instinto de sobrevivencia que me ayudó a salir adelante en la carrera.

A los H.H.H. Guamos (Marcela, Celina, Cesar, Alejandro, Tsuyoshi, Marco, Yadira, Israel, Dahren y Gerardo) por todo lo que pasamos juntos y por la amistad que de estas vivencias surgió.

A Clarissa por ser siempre una gran amiga a pesar de las distancias.

A Alejandra por su amistad y cariño.

A Anitry por cuidarnos, chiquearnos y hasta algunas veces alimentarnos, gracias trinitron.

A Abril por todo el afecto, amistad y apoyo que me ha brindado.

A Magui (a. tutis) por su amistad y ayuda en el inglés.

A las Guías por su amistad y campamentos.

A la banda (Cesar, Dahren, Gerardo, Julio y Dago) por la gran amistad que nos une y que nos ayudó a salir de apuros, hasta de los de la escuela.

A la banda pesada de Valles (Fito, Mauricio, el Jobo, Víctor, etc.) por no cambiar a pesar de que el tiempo a veces trate de obligarnos a hacerlo.

ÍNDICE

1.-Introducción.....	1
2.-Objetivo.....	6
3.-Metodología.....	7
3.1.-Recolecta.....	7
3.2.-Preservación de muestras.....	7
3.3.-Rendimiento.....	9
3.4.-Reología y Análisis físico.....	9
3.5.-Análisis químico.....	12
3.6.-Análisis estadístico.....	13
4.-Resultados.....	14
5.-Discusión.....	21
6.-Conclusiones.....	28
7.-Bibliografía.....	29

LISTA DE TABLAS

Tabla I.-Variación estacional en el rendimiento de agar, fuerza de gel, contenido de 3,6-anhidrogalactosa en el agar, contenido de sulfatos en el agar, temperaturas de gelificación y de fusión.....	14
Tabla II.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los rendimientos de agar obtenidos en un ciclo estacional.....	15
Tabla III.-Resultado de las pruebas estadística realizadas a la fuerza de gel de los agares obtenidos en un ciclo estacional.....	15
Tabla IV.-Coeficiente de correlación lineal encontrados entre la fuerza de gel y las demás variables determinadas.....	16
Tabla V.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los contenidos de 3,6-anhidrogalactosa en agares obtenidos en un ciclo estacional.....	17
Tabla VI.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los contenidos de sulfato en los agares obtenidos en un ciclo estacional.....	18
Tabla VII.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a las temperaturas de gelificación de los agares obtenidos en un ciclo estacional.....	19

Tabla VIII.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a las temperaturas de fusión de los agares obtenidos en un ciclo estacional.....	19
Tabla IX.-Variación entre las muestras de diferente coloración (mayo'96 clara y mayo'96 oscura).....	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Gracilariopsis lemaneiformis</i> (Tomado de Abbott y Hollenberg, 1976).....	3
Figura 2.-Zona de recolecta. Bahía de las Animas, B.C. México.....	8

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1.-Gráfica de fuerza de gel vs. deformación para un gel de agar al 1.5% de <i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	11
Gráfica 2.-Rendimiento y fuerza de gel obtenidos de las muestras del ciclo estacional y de las de diferente coloración.....	16

1.-INTRODUCCIÓN

Las algas marinas pertenecientes a los órdenes Gelidiales y Gracilariales producen agares que son usados como agentes gelificantes en la industria farmacológica, biomédica y de alimentos (Bird y Hinson, 1992); además, a partir de la parte neutra de los agares (agarosas) se producen geles que forman una matriz adecuada para la separación de biopolímeros por electrodifusión (Sigma Aldrich, 1987). Especies de *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *Gelidium*, *Pterocladia* y *Gelidiella* son consideradas como la principal fuente productora de agar, de las cuales la producción mundial ha sido estimada en 48340 tm secas, con la siguiente composición: *Gracilaria* (incluida *Gracilariopsis*) con 25540 tm (53 %), *Gelidium* con 21500 tm (44 %) y *Pterocladia* y *Gelidiella* con 1300 tm (3 %). Los agares extraídos de estas agarofitas presentan variación estacional en el rendimiento y su calidad, debido a factores ambientales (estación del año y localidad, entre otros), factores biológicos (edad del tejido, fase reproductiva y variaciones genéticas, entre otros) y método de extracción y de purificación.

Los agares son polímeros lineales compuestos por la sucesión de dos unidades alternantes: β -D-galactosa y α -L-3,6-anhidrogalactosa unidas entre sí con enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ y del $\alpha(1\rightarrow3)$, y se dividen en dos fracciones: agarosa (que produce geles muy fuertes, es un polímero neutro, esencialmente libre de grupos con carga negativa) y agaropectina (ésta es la fracción de agar con mayor contenido de grupos con carga negativa, por lo tanto es de carácter hidrofílico y de muy baja capacidad gelificante) (Araki, 1937).

En México, la utilización de las algas puede considerarse incipiente; si bien *Gelidium robustum* ha sido durante mucho tiempo la única agarofita que se ha estado explotando e industrializando en México (Guzmán del Proó, 1969), existen en el Pacífico de Baja California por lo menos 19 especies de *Gracilaria* (Aguilar-Rosas, 1982) que podrían ser explotadas, solamente en el Golfo de California se han reportado 16 especies de *Gracilaria* (Norris, 1985). Recientemente se ha iniciado la comercialización de *Gracilaria* de mantos localizados en Laguna de San Ignacio, Baja California Sur (Zertuche, 1994) y de mantos de *Gracilariopsis lemaneiformis* en Bahía de las Animas, Baja California.

Las especies más frecuentes, con cierta abundancia y susceptibilidad de ser explotadas son *Gracilaria verrucosa* (Hudson) Papenfus (ahora *Gracilaria pacifica* Abbott) y *Gracilaria sjoestedtii* Kylin (ahora *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory) Dawson, Acleto et Foldvik 1964) (Aguilar-Rosas *et al.*, 1982). En el Golfo de California se han observado extensos mantos de *G. lemaneiformis* en los meses de febrero a junio (I. Pacheco comunicación personal, 1995), de la cual sus agares (extracción con pretratamiento alcalino) producen geles con una fuerza de 825 g/cm², unidades Nikan (Correa y Pacheco, en proceso).

Gracilariopsis lemaneiformis (figura 1) presenta un talo erecto, ramificado de hasta 2 m de largo de color rojo amarillento. Ejes erectos que parten de una estructura de fijación discoidal con ramificaciones esparcidas e irregulares, cilíndricas de 0.5 a 1.5 mm de diámetro. Usualmente crece sobre rocas cubiertas de arena en la zona intermareal media en estuarios y



Figura 1.- *Gracilariopsis lemaneiformis*. (tomado de Abbott y Hollenberg, 1976). Escala 3 cm.

bahías protegidas. La distribución geográfica conocida comprende desde Columbia Británica hasta Costa Rica, encontrándose también en Perú y en China. En México, se localiza en todo el Pacífico mexicano (Scagel *et al.*, 1989).

El rendimiento y la calidad de los agares son afectados por factores ambientales, fisiológicos y celulares, que modifican la fisiología del alga. La variación estacional del rendimiento y la calidad del agar ha sido observada por varios autores: Oza (1978) encontró que el rendimiento de agar de *Gracilaria corticata* era bajo en agosto-octubre pero alto en abril-julio, Yang y Wang (1983) reportan que en China la fuerza de gel de *Gracilaria* es alta de octubre a febrero y baja durante el verano, Luhan (1992) encontró para *Gracilaria heteroclada* fuerzas de gel altas de octubre a marzo (510 a 794 g/cm²) y bajas de mayo a agosto (43 a 101 g/cm²), Bird y Hinson (1992) indican una variación en el rendimiento de agar de *Gracilariopsis lemaneiformis* de 9.6 % en noviembre a 20.6 % en agosto; mientras otros no reportan variación (Lahaye y Rochas, 1991). Pondevia y Hurtado (1996) reportan que la localidad influye en el rendimiento y la calidad de los agares. Los parámetros físicos y nutricionales afectan la calidad y rendimiento de agar de las algas, ya que se ha visto que al incrementarse el contenido de nitrógeno en el medio se incrementa el contenido de nitrógeno en el tejido del alga, decreciendo el rendimiento de agar, pero incrementándose la fuerza de gel (Lahaye y Rochas, 1991). Los factores celulares, en particular la edad del tejido, fueron relacionados con la calidad de los agares de *Gracilaria tikvahiae* (Craigie y Wen, 1984), Lahaye y Rochas reportan que el contenido

de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG) es alto en el agar de tejido joven, mientras el contenido de sulfatos y metilos es más alto en agar de tejido viejo. Whyte *et al.* (1981) reportan que la fase reproductiva de un alga afecta la calidad de los agares, mientras que Usov *et al.* (1979) citado por Lahaye y Rochas (1991) no encontró mayor diferencia entre éstas. Craigie *et al.* (1984) encontró que el genotipo específico de varias cadenas algales afecta las propiedades químicas y físico-químicas del agar.

Actualmente la compañía mexicana Phycos S.A. de C.V. está explotando mantos de *Gracilariopsis lemaneiformis* en Bahía de las Animas. En este estudio se evaluó estacionalmente el rendimiento y la calidad (reología y análisis químico) de los agares de uno de estos mantos, con el fin de generar información que le permita a dicha compañía, negociar los precios de su producto con base en su calidad y enfocar su esfuerzo de producción en la estación o estaciones del año, con mayor calidad de los agares.

2.-OBJETIVO

Evaluar estacionalmente el rendimiento, la reología (fuerza de gel y flexibilidad), las propiedades físicas (punto de fusión, punto de gelificación e histerésis) y la composición química (contenido de 3,6-anhidrogalactosa y contenido de grupos sulfatos) en los agares de *Gracilariopsis lemaneiformis* de Bahía de las Animas, B.C., México.

3.-METODOLOGÍA

3.1.-Recolecta

Las muestras de *Gracilariopsis lemaneiformis* fueron recolectadas al azar de la zona submareal (a una profundidad aproximada de 3 m), con ayuda de buceo autónomo, por parte del M.C. Isai Pacheco y su grupo de trabajo, en sustrato arenoso, en un manto localizado en Bahía de las Animas (Golfo de California), Baja California, México (figura 2), entre los 28° 48' y 28° 53' de latitud Norte y 113° 15' y 113° 23' de longitud Oeste.

3.1.1.-Recolecta de muestras estacionales

Se llevó a cabo durante un ciclo estacional durante las siguientes fechas de colecta: 20 de mayo de 1995 (primavera), 20 de agosto de 1995 (verano), 20 de noviembre de 1995 (otoño), 20 de febrero de 1996 (invierno).

3.1.2.-Recolecta de muestras de diferente coloración

Después del ciclo estacional se recolectaron en la primavera de 1996 (20 de mayo de 1996) dos muestras diferenciadas entre sí por su coloración: roja (oscura) y roja-verde (clara).

3.2.-Preservación de muestras

Las muestras se secaron al sol en la playa en la zona de recolecta y se transportaron a las instalaciones de la Facultad de Ciencias Marinas donde se lavaron con agua corriente, se secaron a 60°C en estufa de

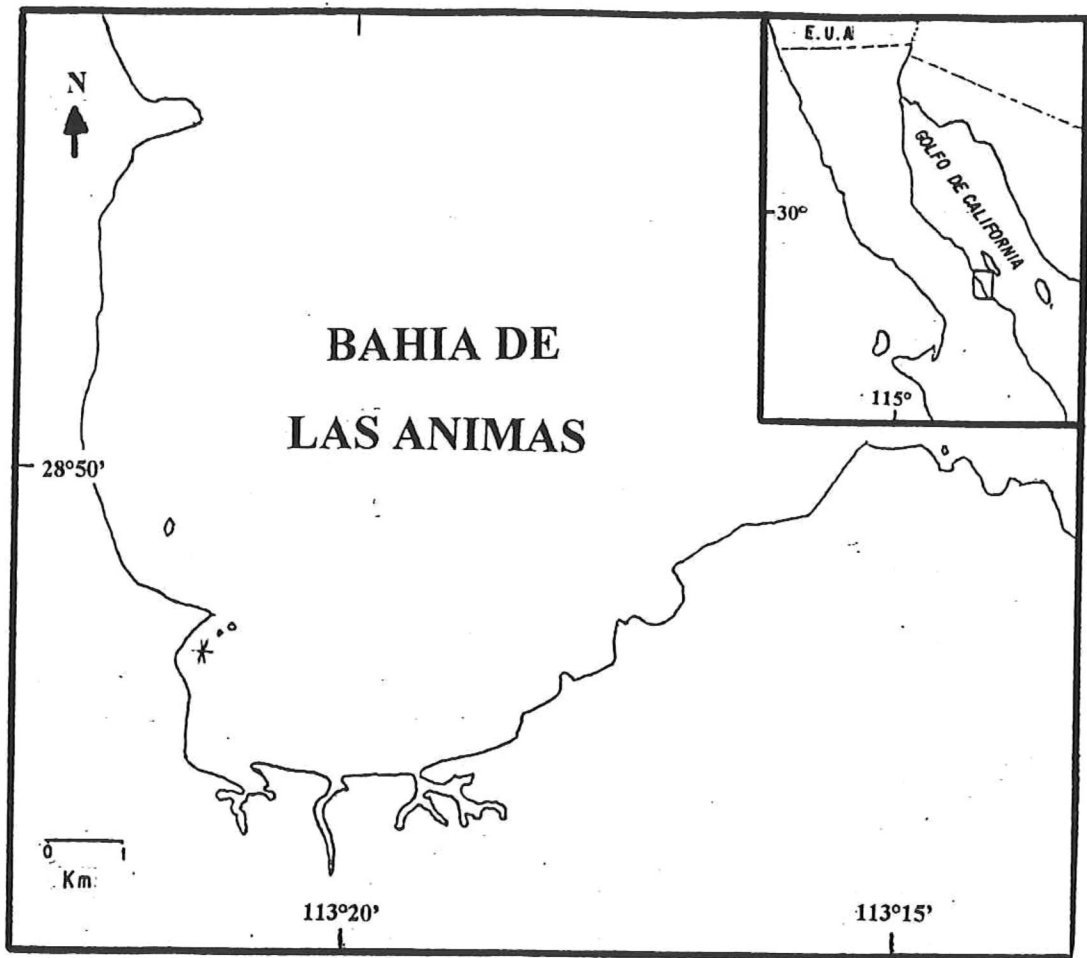


Figura 2.- Área de recolecta. Bahía de las Animas, B.C., México. (*)

convección, se molieron a un tamaño de partícula menor de 2 mm y se guardaron en recipientes para su posterior análisis.

3.3.-Rendimiento

3.3.1.-Extracción

Las extracciones de cada muestra se hicieron por triplicado utilizando el método descrito por Ávila *et al.*(1989) con las siguientes modificaciones: 10 g de materia prima, tratamiento alcalino con 200 ml de NaOH al 2.5%, neutralizaciones con 120 ml de H₂SO₄ al 0.02%, blanqueado con 120 ml de hipoclorito de sodio (3gr Cl activo/l) y extracción en 300 ml de agua destilada.

3.3.2.-Cuantificación de agar

El agar se secó en estufa de convección a 65°C hasta obtener peso constante, se calculó el rendimiento y se expresó en términos de g de agar por cada 100 g de muestra seca (%).

3.4.-Reología y Análisis físico

3.4.1.-Preparación de geles

Se prepararon soluciones de agar al 1.5% y se sometieron a ebullición con reflujo. Se vertió la solución caliente en 4 vasitos de plástico de 30 ml. Una vez formado el gel se invirtieron los recipientes y se dejaron reposar durante una noche.

3.4.2.-Fuerza de gel y flexibilidad

Se evaluó la fuerza de gel y la flexibilidad en geles preparados al 1.5% con el Equipo Gel-Lab (Correa, en proceso) que consiste en que:

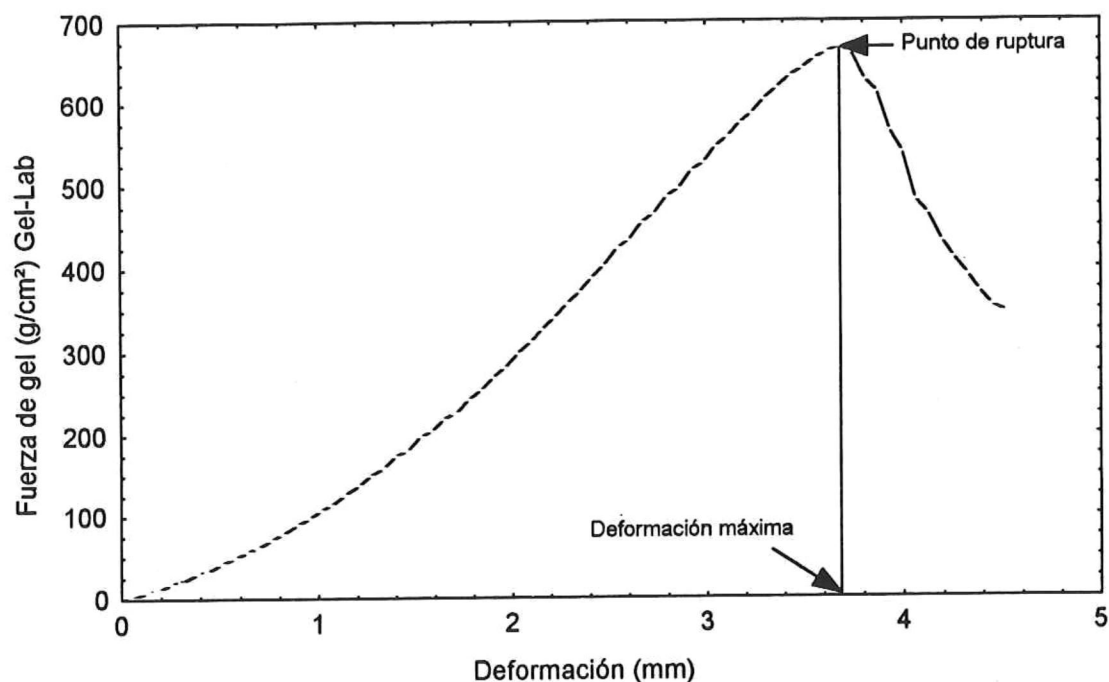
Las señales de esfuerzo y deformación generadas por la compresión de un gel, por un émbolo de 0.1237 cm² sobre un sensor de presión a una velocidad constante de 0.254 mm/s, se registran en computadora vía tarjeta de conversión analógico-digital. Los datos procesados (Excel) dan una gráfica de esfuerzo vs. deformación de donde se obtiene el esfuerzo de ruptura del gel (fuerza de gel) y la penetración del émbolo (en mm) hasta la ruptura (gráfica 1). La señal de fuerza de gel registrada por el equipo se convierte a unidades Nikan mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Fuerza de gel en unidades Nikan (g/cm}^2\text{)} = \text{Gel-Lab} * 0.515$$

- Gel-Lab: esfuerzo de ruptura gel registrada por el gelómetro.
- 0.515: factor de conversión a unidades Nikan.

La flexibilidad de los geles se obtiene de los datos generados por el equipo Gel-Lab mediante la relación:

$$\text{Flexibilidad} = \frac{\text{mm de penetración}}{\text{Fuerza de Gel (Gel-Lab)}} * 100$$



Gráfica 1.- Gráfica de fuerza de gel vs. deformación para un gel de agar al 1.5 % de *Gracilariopsis lemaneiformis*

3.4.3.-Punto de fusión

Se determinó por el método propuesto por Armisén (1993), que consiste en:

Sumergir los tubos de ensayo que contienen los geles en un vaso de precipitado con agua y calentar gradualmente sobre plancha de calentamiento. Cuando la temperatura es superior a los 60°C se comienza a monitorear periódicamente el estado físico del gel inclinando el tubo de ensayo dentro del vaso de precipitado. Cuando al inclinar el tubo el gel fluye de acuerdo al cambio se introduce el termómetro dentro del tubo y se registra el punto de fusión.

3.4.4.-Punto de gelificación

Se determinó por el método propuesto por Armisen (1993), que consistió en:

Transferir los geles fundidos a un vaso con agua a 60°C y se colocan inclinados y a cada tubo se introduce un termómetro. Mientras la solución del gel se va enfriando se mueve el tubo, cuando deje de fluir según el cambio se registra el punto de gelificación.

3.4.5.-Histéresis

Se determinó restando la temperatura de gelificación a la temperatura de fusión correspondiente.

3.5.-Análisis químico

3.5.1.-Cuantificación de 3,6-anhidrogalactosa (3,6-AG)

Se determinó mediante el método colorimétrico descrito por Yaphe y Arsenault en 1965 y modificado por Craigie y Leigh en 1978, usando fructosa como estándar y 1.08 como factor de corrección.

3.5.2.-Cuantificación de sulfatos

Se determinó el contenido de sulfatos por el método turbidimétrico con BaCl_2 de Tabatabai (1974), con modificaciones de Craigie y Wen (1984), con sulfato de potasio como estándar a concentraciones de 6 a 300 $\mu\text{g/ml}$.

3.6.-Análisis estadístico

Al ser n pequeña ($n=3$) se decidió utilizar estadística no paramétrica. A los resultados obtenidos de las muestras estacionales se les aplicó una prueba Kruskal Wallis con un $\alpha= 0.05$, para determinar si había diferencias significativas de estación a estación, la prueba se realizó con el programa Statistica for Windows Versión 4.2 y al ser la hipótesis nula rechazada, se determinaron las diferencias significativas entre estaciones por medio de comparaciones múltiples no paramétricas con un $\alpha= 0.05$ (Zar, 1984). A los resultados obtenidos de las muestras de diferente coloración se les aplicó una prueba de Mann-Whitney con el programa Statistica for Windows Versión 4.2, para buscar si existían diferencias en el rendimiento y la calidad de sus agares. Se realizaron correlaciones de Spearman para determinar la relación que existía entre las variables que se determinaron, utilizando el paquete estadístico Statistica for Windows Versión 4.2.

4.-RESULTADOS

El rendimiento de agar de las muestras estacionales fluctuó entre un mínimo de 8.166 % en agosto (verano) a un máximo de 15.376 % noviembre (otoño) (tabla I y gráfica 2), el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el rendimiento de las muestras (tabla II).

Tabla I.-Variación estacional en el rendimiento de agar, fuerza de gel, contenido de 3,6-AG en el agar, contenido de sulfatos en el agar, temperaturas de fusión y de gelificación. Todos los datos son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar ($\pm$), con excepción de la histéresis que es la diferencia entre la temperatura de fusión con la temperatura de gelificación.

	Primavera	Verano	Otoño	Invierno
ANÁLISIS	mayo'95	agosto'95	noviembre'95	febrero'96
Rendimiento %	8.506 $\pm$ 0.508	8.166 $\pm$ 0.717	15.37 $\pm$ 1.421	10.83 $\pm$ 1.179
Fuerza de gel g/cm²	220.89 $\pm$ 11.51	324.84 $\pm$ 39.26	216.81 $\pm$ 23.67	785.47 $\pm$ 9.25
3,6-AG %	35.88 $\pm$ 0.32	42.64 $\pm$ 0.848	35.51 $\pm$ 1.111	47.82 $\pm$ 1.111
Sulfatos %	2.17 $\pm$ 0.03	2.22 $\pm$ 0.14	2.68 $\pm$ 0.085	0.76 $\pm$ 0.041
Temp. fusión °C	91.66 $\pm$ 0.577	92 $\pm$ 0	93.66 $\pm$ 0.577	96 $\pm$ 0
Temp. gel °C	34.66 $\pm$ 0.577	35 $\pm$ 0	34.33 $\pm$ 0.577	36.83 $\pm$ 0.577
Flexibilidad cm²mm/g	0.48 $\pm$ 0.016	0.51 $\pm$ 0.076	0.54 $\pm$ 0.048	0.2 $\pm$ 0.003
Histéresis °C	57	57	59	59

Tabla II.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los rendimientos de agar obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		NS	S	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

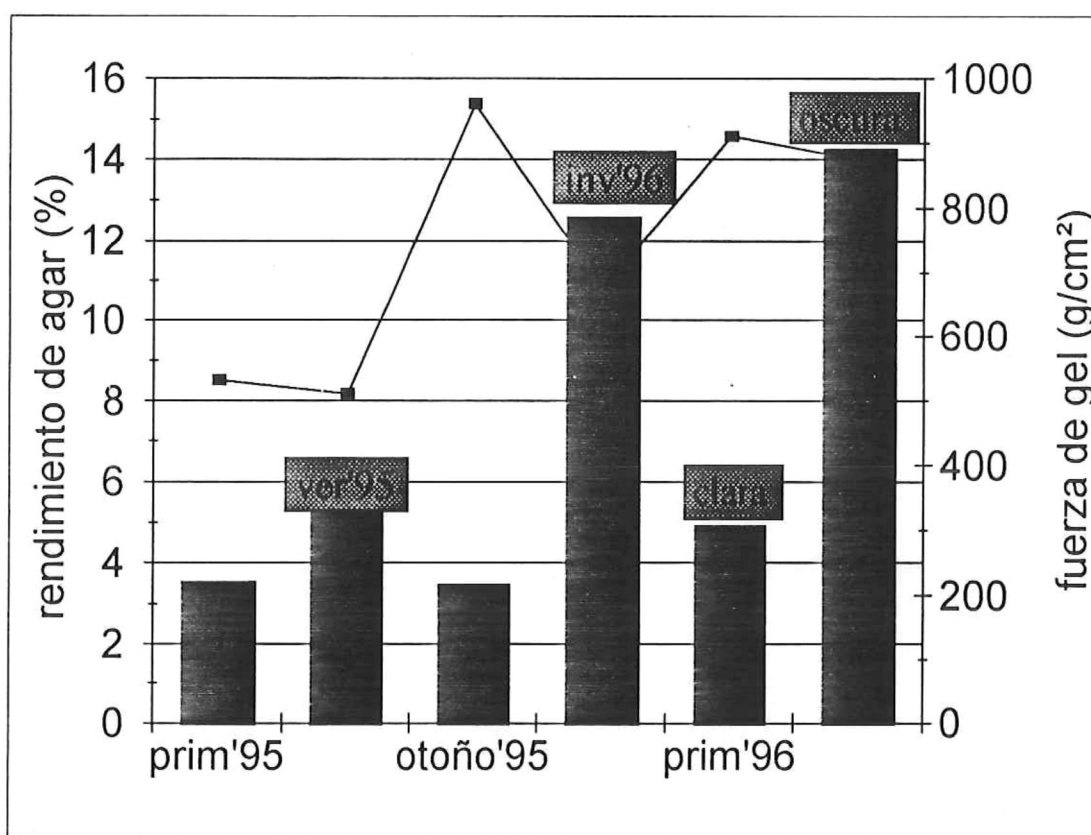
El valor máximo de fuerza de gel fue de 785 g/cm² en febrero (invierno) y el mínimo de 217 g/cm² en noviembre (otoño) (tabla I y gráfica 2), encontrándose diferencias significativas entre los valores de fuerza de gel de las muestras (tabla III). Entre el rendimiento y la fuerza de gel se encontró una correlación de -0.076 (ver tabla IV).

Tabla III.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a la fuerza de gel de los agares obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		S	NS	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

Tabla IV.-Coeficientes de correlación lineal encontrados entre la fuerza de gel y las demás variables determinadas.

	coef. de correlación
rendimiento vs. fuerza de gel	-0.076923
fuerza de gel vs. 3,6-anhidrogactosa	0.849128
fuerza de gel vs. grupo sulfatos	-0.706294
fuerza de gel vs. temperatura de gel	0.855380
fuerza de gel vs. temperatura de fusión	0.428235



Gráfica 2.-Rendimiento y fuerza de gel obtenidos de las muestras del ciclo estacional y de las de diferente coloración. Los valores de la fuerza de gel están representados con barras y los de rendimiento con líneas.

Se encontró que el valor máximo en el contenido de 3,6-AG fue de 47.82% en febrero (invierno) y el mínimo de 35.51% en noviembre (otoño) (tabla I), el contenido de 3,6-AG presentó diferencias significativas entre los diferentes meses de análisis (tabla V). La correlación entre la fuerza de gel y el contenido de 3,6-AG fue de 0.849 (ver tabla IV).

Tabla V.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los contenidos de 3,6-anhidrogalactosa en agares obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		S	NS	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

El máximo contenido de grupos sulfatos encontrado fue de 2.68% en noviembre (otoño) y el mínimo fue de 0.76% en febrero (invierno) (tabla I); existen diferencias significativas entre el contenido de grupos sulfatos de las muestras (tabla VI). La correlación que se presentó entre la fuerza de gel y el contenido de sulfatos es de -0.706 (tabla IV).

Tabla VI.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a los contenidos de sulfato en los agares obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		NS	S	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

La temperatura de gelificación mínima encontrada en este trabajo fue de 34.33° C en noviembre (otoño) y la máxima de 36.66° C en febrero (invierno), y la temperatura de fusión más baja fue de 91.66°C en mayo (primavera) siendo la más alta de 96°C en febrero (invierno) (tabla I); se encontraron diferencias significativas entre estaciones tanto en las temperaturas de fusión como en la de gelificación (tablas VII y VII). Las correlaciones entre la fuerza de gel y la temperatura de gelificación y de fusión son de 0.855 y 0.428, respectivamente (tabla IV).

Tabla VII.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a las temperaturas de gelificación de los agares obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		S	NS	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

Tabla VIII.-Resultado de las pruebas estadísticas realizadas a las temperaturas de fusión de los agares obtenidos en un ciclo estacional. S= diferencia significativa y NS= diferencia no significativa, para un $\alpha=0.05$.

	PRIMAVERA	VERANO	OTOÑO	INVIERNO
PRIMAVERA		NS	S	S
VERANO			S	S
OTOÑO				S
INVIERNO				

La histéresis más alta se encontró en los meses de noviembre (otoño) y febrero (invierno) (59° C) y la más baja en los meses de mayo y agosto (57° C).

La máxima flexibilidad se encontró en los geles de la muestra de noviembre (otoño) ($0.54 \text{ cm}^2\text{mm/g}$) y la menor en febrero (invierno) ($0.2 \text{ cm}^2\text{mm/g}$).

Al compararse la muestra de mayo'96 clara con mayo'96 oscura se encontraron diferencias significativas en todas las variables determinadas en sus geles con excepción del rendimiento y la temperatura de gelificación.

Tabla IX.-Variación entre las muestras de diferente coloración (mayo'96 clara y mayo'96 oscura). Los datos que se presentan son el promedio de tres réplicas con su respectiva desviación estándar, pero la comparación se llevo a cabo utilizando los tres datos obtenidos por muestra para cada variable. NS= diferencia no significativa y S= diferencia significativa.

	mayo'96 clara	mayo'96 oscura	diferencia
Rendimiento %	14.58 ± 0.295	13.99 ± 0.614	NS
Fuerza de gel g/cm^2	307.15 ± 32.03	891.49 ± 34.3	S
3,6-AG %	41.53 ± 0.641	46.53 ± 0.848	S
Sulfatos %	2.18 ± 0.091	0.93 ± 0.03	S
Temp. fusión $^{\circ}\text{C}$	95 ± 0	98 ± 0	S
Temp. gelific. $^{\circ}\text{C}$	35.33 ± 0.577	35 ± 0	NS

5.-DISCUSIÓN

Gracilariopsis lemaneiformis mostró una variación estacional en el rendimiento de agar, lo cual coincidió con los resultados que muestran otros estudios realizados en especies de *Gracilaria* y *Gracilariopsis* (Hoyle, 1978; Whyte *et al.*, 1981; Bird y Hinson, 1992; Pondevia y Hurtado, 1992; Price y Bielig, 1992). Armisen (1993) reporta que el rendimiento y calidad de los agares varía según la especie y los efectos de ciertos factores ambientales, como la luz, nutrientes y temperatura, relacionados con el crecimiento del alga.

Los rendimientos obtenidos (8.16 % - 15.37 %) son relativamente bajos con relación a lo reportado para *Gracilariopsis lemaneiformis* por otros autores en otras localidades (Bird y Hinson, 1992 (9.6 % - 20.6 %); Chinapart *et al.*, 1995 (40.3 %)). La variación en los valores reportados para la misma especie podría ser parcialmente atribuida a procedimientos distintos de extracción (McLachlan y Bird, 1986) o, a diferencias debidas al sitio de colecta, las cuales podrían deberse a diferencias genéticas entre las poblaciones o a las distintas condiciones prevalecientes del medio ambiente en la zona de colecta (Chennubhotla *et al.*, 1986).

En lo referente a la variación atribuida a los distintos procedimientos de extracción, Armisen y Galatas (1987) mencionan que el método de extracción apropiado varía según la especie, por ejemplo los agares de *Gracilaria* se distinguen por formar geles débiles, por lo que para obtener agares de alta capacidad gelificante, se requiere de la aplicación de un

pretratamiento alcalino; esto causa la hidrólisis de grupos sulfatos y transforma cantidades importantes de α -L-galactosa-6-sulfato (cargada) a α -L-3,6-anhidrogalactosa (neutra) con lo cual se incrementa notablemente la capacidad del agar de formar geles fuertes, pero se reduce el rendimiento.

La fuerza de gel de los geles formados con agar, es una de las características que determinan las aplicaciones que encuentran estos polisacáridos algales en alimentos, industria y biotecnología. Se encontró una variación estacional alta en las fuerzas de gel de *Gracilariopsis lemaneiformis*; estas diferencias estacionales también han sido observadas tanto en especies de *Gracilaria* como de *Gracilariopsis* (Hoyle, 1978; Whyte *et al.*, 1981; Bird y Hinson, 1992; Luhan, 1992; Pondevia y Hurtado, 1992).

Luhan (1992) indica que los distintos cambios en las fuerzas de gel y el rendimiento coinciden con los cambios en las condiciones ambientales (temperatura, salinidad, lluvia y nutrientes); por lo que es posible que las variaciones ambientales, las cuales varían de estación a estación, afecten las respuestas fisiológicas generando variación en la fuerza de gel y el rendimiento de agar del alga.

Se encontró una correlación baja entre el rendimiento y la fuerza de gel; otros estudios en cambio reportan correlaciones altas (Luhan, 1992; Pondevia y Hurtado, 1992).

Los agares se componen de una secuencia repetitiva de unidades disacáridas formadas por la β -D-galactosa (1->4) y la α -galactosa (1->3), en forma α -L. En la unidad α se puede generar un anillo interno de 3,6-AG y es

únicamente en polisacáridos de algas rojas donde se puede encontrar esta molécula. El contenido y distribución de la 3,6-AG se relaciona directamente con la calidad de estos polímeros, por lo cual es importante determinarla. Se observó variación estacional en el contenido de 3,6-AG del agar, lo cual también coincide con lo encontrado por Bird y Hinson (1992) y por Yeniguel (1993). El contenido de 3,6-AG de *Gracilariopsis lemaneiformis* de Bahía de las Animas, B.C. presentó un comportamiento similar al de *Gracilariopsis lemaneiformis* de Carolina del Norte, EE.UU. que reportan Bird y Hinson (1992) presentando también su máximo en invierno.

La correlación alta que se encontró entre la fuerza de gel y el contenido de 3,6-AG (0.849) confirma lo reportado por Bird (1987), quien indica que a mayor contenido de 3,6-AG se obtiene una mayor fuerza de gel en el agar.

La presencia de grupos sustituyentes en posiciones donde no interfieren con la conformación, $\alpha(4C1)$, de la 3,6-AG no alteran la capacidad gelificante del polímero, pero sí modifican las características reológicas y de histéresis de los geles formados; un ejemplo de ello son los grupos sulfatos que confieren al gel mayor afinidad al agua y por lo tanto menor rigidez. Se encontró variabilidad estacional en el contenido de grupos sulfatos. Al igual que en este trabajo, Pondevia y Hurtado (1992) y Yeniguel (1993) reportan variación estacional en el contenido de sulfatos.

Craigie y Wen (1984) reportan que el tejido joven contiene una mayor concentración de grupos sulfatos lábiles que pueden ser removidos por tratamiento alcalino antes de la extracción de agar, mientras que el tejido

viejo contiene una alta concentración de grupos sulfatos estables los cuales no pueden ser removidos por tratamiento con NaOH; este hecho sugiere que la muestra de febrero es la de tejido más joven la cual sigue envejeciendo hasta llegar a la muestra de noviembre, donde se ha reportado la menor biomasa (García-Rojas comunicación personal, 1996), este ciclo coincide con lo encontrado por Luhan (1992) para *Gracilaria heteroclada* de Filipinas.

La correlación negativa que se observó en este trabajo entre la fuerza de gel y el contenido de grupos sulfatos, ha sido reportada también por Pondevia y Hurtado (1992) para *Gracilaria bailinae* de Zarraga, Filipinas. Asare (1980) indica que una baja fuerza de gel puede deberse a un alto contenido de grupos sulfatos.

Otro ejemplo de grupos sustituyentes son los grupo metilos que modifican la temperatura de gelificación y fusión; Giuseley (1970) ha reportado que a mayor contenido natural de grupo metilo en el agar la temperatura de gelificación aumenta, pero a mayor contenido de grupo metilo adicionado artificialmente la temperatura de gelificación disminuye. Fueron observadas variaciones estacionales en la temperatura de fusión y de gelificación en los agares de *Gracilariopsis lemaneiformis*. Pondevia y Hurtado (1992) también han reportado variación estacional para la temperatura de gelificación y de fusión.

La fuerza de gel también estuvo bien correlacionada con las temperaturas de gel, esta correlación ha sido observada por Cote y Hanisak (1986) y por Pondevia y Hurtado (1992). Esta correlación la explica Bird *et*

al. (1981), al decir que la fuerza de gel está asociada con el peso molecular mayor y los polímeros más largos, ambos reflejan una alta capacidad para formar redes en tercera dimensión entre el agua y las hélices del gel. Por lo que la presencia de cadenas más largas de polímeros en las muestras de agar una fuerza de gel alta va a causar gelificación a una temperatura más baja, mientras que cadenas cortas en agar con baja fuerza de gel podrían gelificar a una temperatura más alta.

Así como la fuerza de gel, la histéresis también determina las aplicaciones que encuentran estos polisacáridos. La histéresis más grande que se encontró fue en noviembre'95 (Otoño) y febrero'96 (Invierno) y la más pequeña en mayo'95 (Primavera) y agosto'95 (Verano), pero ambas estuvieron dentro de lo establecido para agares de uso microbiológico por US Pharmacopoeia and US Chemicals Codex (57°C) (Selby y Whistler, 1993 en Armisen, 1995).

La muestra de mayo'96 oscura presentó una mayor fuerza de gel que la muestra de febrero'96. Lo anterior posiblemente sea debido a que de febrero a mayo el manto se está renovando, con lo cual en mayo el tejido tendría aproximadamente 3 meses de edad, y Thomas y Krishnamurthy (1976) encontraron que la mayor fuerza de gel se encontraba en plantas cultivadas de 3 meses de edad, lo que podría explicar el porque en mayo se presentó una mayor fuerza de gel. Al considerar mayo'95 y mayo'96 clara, esta idea podría refutarse; sin embargo, si en algunas partes del manto, el tejido se hubiera empezado a renovar desde diciembre, tal como lo reporta Luhan (1992) para *Gracilaria heteroclada* de Filipinas, entonces habría unas

partes más viejas y por lo tanto de menor calidad en sus agares. En las estaciones posteriores (verano y otoño), el tejido de las algas del manto ya se encuentra más homogeneizado, por lo que ya no hay diferencias notorias en su coloración.

Los valores obtenidos para mayo'96 oscura en los resultados generales presentaron diferencias más notables con mayo'95 que mayo'96 clara. La mayor similitud de mayo'95 con mayo'96 clara que con mayo'96 oscura puede deberse a que ambas pudieran ser de las partes más claras del manto, ya que para esta misma zona en un muestreo de *Gracilariopsis lemaneiformis* en mayo de 1995 se obtuvieron agares de fuerza de gel de 825 g/cm² (Correa y Pacheco, en proceso), probablemente de las partes oscuras del manto.

Luhan (1992) reporta que *Gracilaria heteroclada* cuando se encuentra saludable presenta un color café oscuro, por lo que se podría afirmar que la muestra oscura de mayo'96 presenta tejido más saludable y por lo tanto mejor calidad de gel. Por lo anterior se recomienda coleccionar para esta época del año las partes oscuras del manto.

Gracilariopsis lemaneiformis está actualmente siendo explotada y exportada al Japón por la industria Phycos S.A. de C.V., por lo que es importante determinar en qué estaciones el agar de esta alga presenta la calidad comercial requerida por este país. Para agar japonés todas las estaciones presentaron (basándose en la fuerza de gel) al menos agar grado No. 2 (≥ 200 g/cm²) en cuadros y agar grado No. 3 (≥ 150 g/cm²) en tiras, de acuerdo con lo que Okazaki (1971) reporta que se requiere; no obstante

los agares de febrero presentan características muy superiores a estos grados de agar.

Un agar comercial de *Gracilaria* tiene una fuerza de gel de 650 g/cm², una temperatura de fusión no menor de 90° C, una temperatura de gelificación no mayor de 38° C y una concentración de 3,6-anhidrogalactosa del 39.6% (Bird, 1987). Sólo los agares de febrero (invierno) y los de mayo'96 oscura presentan la calidad suficiente para comercializarse bajo estas especificaciones. La muestra de otoño presentó la menor calidad de gel.

6.-CONCLUSIONES

Los agares de *Gracilariopsis lemaneiformis* (Bory) Dawson, Acleto *et* Foldvik 1964 de Bahía de las Animas, B.C., México presentan variación estacional en su rendimiento y calidad.

El rendimiento de agar de *Gracilariopsis lemaneiformis* varió de un mínimo de 8.16 % en agosto (verano) a un máximo de 15.37 % en noviembre (otoño). La máxima fuerza de gel se registró en febrero (invierno) de 785 g/cm² y la mínima en noviembre (otoño) de 216 g/cm². El contenido de 3,6-anhidrogalaactosa fluctuó de 35.51 % en noviembre (otoño) a 47.82 % en febrero (invierno). La concentración de sulfatos en el agar presentó una variación de 0.76 % en febrero (invierno) a 2.68 % en noviembre (otoño). La histéresis osciló de 57° C en mayo y agosto a 59° C en noviembre y febrero.

Se presentó una correlación baja entre el rendimiento y la fuerza de gel de -0.076 y una alta correlación entre la fuerza de gel y el contenido de 3,6-anhidrogalaactosa (0.849) así como también entre la fuerza de gel y el contenido de sulfatos (-0.706). La temperatura de gelificación y de fusión están correlacionadas con la fuerza de gel (0.855 y 0.428 respectivamente).

De las muestras de diferente coloración, la muestra oscura de mayo de 1996 tuvo la más alta fuerza de gel (891.49 g/cm²) y la muestra clara de mayo de 1996 presentó una fuerza de gel de 307.15 g/cm².

7.-BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, I.A. y Hollenberg G.J. (1976). *Marine Algae of California*. Stanford University Press. Estados Unidos. 827 pp.
- Aguilar-Rosas, R. (1982). Identificación y distribución de las algas marinas del Estero de Punta Banda, B.C., México. **Ciencias Marinas**, 8 (1): 78-87.
- Aguilar-Rosas, L.E., Aguilar-Rosas, R., Pacheco-Ruíz, I., Bórquez-García, E., Aguilar-Rosas, M.A. y Urbietta-González, E. (1982). Algas de importancia económica de la región noroccidental de Baja California, México. **Ciencias Marinas**, 8 (1): 49-63.
- Araki, C. (1937). Acetylation of agar like substance of *Gelidium amansii*. **J. Chem. Soc. Jpn**, 58: 1338-1350.
- Armisen, R. (1993). Curso 4: Agar. En: Master's Degree Course in Applied Algology. **Universidad de Las Palmas de Gran Canaria**. España.
- Armisen, R. (1995). World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology**, 7: 231-243.
- Armisen, R. y Galatas, F. (1987) Production, properties and uses of agar. In: **Production and utilization of products from commercial seaweeds**. (McHugh, D.J., ed.). FAO Fish. Tech. Pap. 288: 57 pp.
- Asare, S.O. (1980). Seasonal changes in sulfate and 3,6 anhydrogalactose content of phycocolloids from two red algae. **Botanica Marina**. 32: 595-598.

- Ávila, M., Badilla, M.J., Cortes, C., Jelce, C. y Aranda, E. (1989)
Resultados generales. En: **Investigación, desarrollo, cultivos y uso industrial de algas *Gracilaria***. Instituto de Fomento Pesquero. Santiago de Chile.
- Bird, K.T. y Hinson, T.K. (1992). Seasonal variations in agar yields and quality from North Carolina agarophytes. **Botanica Marina**, 35: 291- 295.
- Bird, K.T., Hanisak, M.D. y Rhyther, J. (1981). Chemical quality and production of agars extracted from *Gracilaria tikvahiae* grown in different nitrogen enrichment conditions. **Botanica Marina**, 24: 441-444.
- Bird, K.T. (1987). Agar production and quality from *Gracilaria* sp. Strain G-16: Effects of environmental factors. **Botanica Marina**, 31: 33-39.
- Chennubhotla, V.S., Kalimuthu, S., Najmuddin, M., Panigrahy, R. y Selvaraj, M. (1986). Changes in growth and phycocolloid content of *Gelidiella acerosa* and *Gracilaria edulis*. **Seaweed Res. Utiliz.** 9: 45-48.
- Chirapart, A., Ohno, M., Ukeda, H., Sawamura, M. y Kusunose, H. (1995). Chemical composition of agars from a newly reported Japanese agarophyte, *Gracilariopsis lemaneiformis*. **Applied Phycology**, 7 (4): 359-365.
- Correa, F. Gelómetro "Gel-Lab". (en proceso).

- Correa, F. y Pacheco, I. Cuantificación, análisis químico y reología de los agares de *Gracilaria lemaneiformis* del Golfo de California, México. (en proceso).
- Cote, G.L. y Hanisak, H.D. (1986). Production and properties of native agars from *Gracilaria tikvahiae* and other red algae. **Botanica Marina**, 29: 359-366.
- Craigie, J.S. and Leigh, C. (1978). Carrageenans and agars. In: J.A. Hellebust and J.S. Craigie (eds.). **Handbook of phycological methods; physiological and biochemical methods**. Cambridge University Press. 110-131 pp.
- Craigie, J. S. y Wen Z. C. (1984). Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyta). **Can. J. Bot**, 52: 1665-1670.
- Craigie, J.S., Wen, Z.C. y van der Meer, J.P. (1984). Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the compositions of agar from *Gracilaria* spp. **Botanica Marina**, 27: 55-61
- García-Rojas, C.H. (1996). Comunicación pesonal. Domicilio conocido, Bahía de las Animas, B.C., México.
- Giuseley K.B. (1970). The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. **Carbohydrate Research**, 13: 247-256.
- Guzmán del Proó, S.A. (1969). Los recursos vegetales marinos de Baja California, México. **Proc. Intl. Seaweed Symp**, 685-690.

- Hoyle, M.D. (1978). Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapastoris* (Gmelin) Silva and *G. coronopifolia* J. Ag.) from Hawaii. II. Seasonal aspects. **Botanica Marina**, 21: 347-352.
- Lahaye, M. y Rochas, C. (1991). Chemical structure and physico-chemical properties of agar. **Hidrobiologia**, 221:137-148.
- Luhan, Ma. R.J. (1992) Agar yield and gel strength of *Gracilaria heteroclada* collected from Iloilo, Central Philippines. **Botanica Marina**, 35: 169-172.
- McLachlan, J. y Bird, C.J. (1986). *Gracilaria* (Gigartinales, Rhodophyta) and productivity. **Aquatic. Bot**, 26: 27-49.
- Norris, J.N. (1985). Studies on *Gracilaria* Grev. (Gracilariaceae, Rhodophyta) from the Gulf of California, México. In: **Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species** (Abbott, I.A. & J.N. Norris, eds.). California Sea Grant College Program. Univ. of California, La Jolla. 123- 136.
- Oza, R.M. (1978). Studies on the Indian *Gracilaria*. IV. Seasonal variation in agar and gel strength of *Gracilaria corticata* J. Ag. occurring on the coast of Veraval. **Botanica Marina**, 21: 165-167.
- Pacheco, I. (1995). Comunicación personal. Instituto de Investigaciones Oceanológicas de la **Universidad Autónoma de Baja California**. México.
- Pondevia, H.B. y Hurtado-Ponce, A.Q. (1996). Assessment of some agarophytes from the coastal areas of Iloilo, Philippines; II.-Seasonal variations in the agar quality of *Gracilaria changii*, *Gracilaria*

- manilaensis* and *Gracilariopsis bailinae* (Gracilariales, Rhodophyta). **Botanica Marina**, 39:123-127.
- Price, I.R. y Bielig, L.M. (1992). Agar yield from *Gracilaria edulis* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Townsville Region, Eastern Tropical Australia. **Botanica Marina**, 35:457-460.
- Scagel, R.F., Gabrielson, P.W., Garbary, D.J., Golden, L., Hawkes, M.W., Lindstrom, S.C., Oliviera, J.C. y Widdowson, T.B. (1989). A synopsis of the benthic marine algae of British Columbia, southeast Alaska, Wasington and Oregon. Phycological Contribution 3. Department of Botany, **University of British Columbia**, Vancouver, BC, Canada.
- Sigma Aldrich (1987). Reactivos y productos bioquímicos para investigación en ciencias de la vida. Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., México, D.F.
- Tabatabai, M.A. (1974). Determination of sulphate in water samples. **Sulphur Inst. J**, 10: 11-13.
- Thomas, P.C. y Krishnamurthy V. (1976). Agar from some cultured *Gracilaria edulis* (Gmel.) Silva. **Botanica Marina**, 19: 115-117.
- Whyte, J.N.C., Englar, J.R., Saunders, R.G. y Lindsay, J.C. (1981) Seasonal variation in the biomass, quantity and quality of agar from the reproductive and vegetative stages of *Gracilaria* (*verrucosa* type). **Botanica Marina**, 24: 493-501.

- Yang, S.S. y Wang, C.Y. (1983). Effect of enviromental factors on *Gracilaria c.f. verrucosa* (Rodhophyta) in Shantou District Guandong, PROC. **Botanica Marina**, 27: 265-268.
- Yaphe, W y Arsenault, G.P.. (1965). Improved resorcinol reagent for the determination of fructose and of 3,6 anhydrogalactose in polysaccharides. **Anal. Biochem**, 13: 143-148.
- Yeniguel, M. (1993). Seasonal changes in the chemical and gelling characteristics of agar from *Gracilaria verrucosa* collected in Turkey. **Hidrobiologia**, 260-261: 627-631.
- Zar, J.H. (1984). Biostatistical Analysis. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 718 pp.
- Zertuche-González, J.A. (1994). Situación actual de la industria de las algas marinas productoras de ficocoloides en México. En: **Situación actual del cultivo de algas agarofitas en América Latina y el Caribe** (J.A. Zertuche, ed.) FAO. AQUILA II. Documento de campo No. 13: 33-37