

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

"ESTIMACION DEL EFECTO DE HIDROLISIS QUIMICA ACIDA  
EN AGAR DE Gracilaria lemaneiformis"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
O C E A N O L O G O  
presenta:  
TOMAS RAMON FLORVILLE ALEJANDRE

ENSENADA, BAJA CFA.

ABRIL DE 1987.

## J U S T I F I C A C I O N

El presente trabajo formó parte de la Sección Química del Proyecto: "Alternativas de Nutrición en el Cultivo de Organismos Acuáticos" de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California; éste pretendió encontrar solución a uno de los ingredientes tradicionales utilizados en la preparación de dietas para peces y crustáceos, observando una alternativa muy prometedora en el uso de macroalgas (v.gr. Gracilaria lemaneiformis) como fuente de carbohidratos.

En los últimos ocho años se ha observado una abundante biomasa del alga roja Gracilaria lemaneiformis en las costas de Bahía de los Angeles, B.C. . En la actualidad el recurso ha disminuído, sin embargo éste aún se encuentre presente y se sitúa como una alternativa potencial (Ballesteros, Comunicación personal).

## RESUMEN

Se efectuaron 90 hidrólisis de agar del alga roja Gracilaria lemaneiformis bajo tres condiciones de temperatura: 95-96°C, 100-101°C y 110-112°C. Para cada temperatura se experimentaron los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20 y 25 horas; para cada tiempo se efectuaron seis hidrólisis utilizando las siguientes concentraciones de ácido sulfúrico: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.5N. En cada hidrolizado se evaluó el contenido de material reductor y, a partir de éste, se establecieron dos hipótesis de trabajo: 1) El contenido de material reductor es proporcional al grado de hidrólisis. 2) No es posible relacionar grado de hidrólisis con el contenido de material reductor. En base a la primera de éstas hipótesis, se propusieron como condiciones convenientes para hidrólisis máxima del agar de G. lemaneiformis a las siguientes: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a 110-112°C durante 5 horas; y en base a la segunda, la utilización de métodos más directos para la determinación del grado de hidrólisis. En el hidrolizado tratado bajo las condiciones de hidrólisis propuestas se determinó el contenido de material reductor terminal y de 3,6-anhidrogalactosa. Se determinó Proteínas, Cenizas, Lípidos, Fibra Cruda y Carbohidratos en G. lemaneiformis, los resultados obtenidos se compararon con los reportados por otros autores para varias especies de Gracilaria, destacando el elevado contenido proteico del organismo estudiado; por otra parte, se evaluaron Azúcares Reductores, 3,6-Anhidrogalactosa y Sulfatos en su agar. El contenido de 3,6-anhidrogalactosa obtenido utilizando las condiciones hidrolíticas propuestas, sugiere que estas afectan considerablemente la estructura química de los azúcares constituyentes del ficocoloide. Puesto que un elevado porcentaje de la hidrólisis total se completa en los primeros minutos, es probable que ésta se alcance en un tiempo menor a 5 horas. La degradación del agar de G. lemaneiformis con ácido sulfúrico 1N a 110-112°C presumiblemente sigue una cinética química de primer orden.

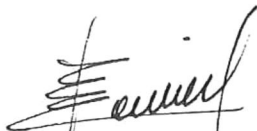
"ESTIMACION DEL EFECTO DE HIDROLISIS QUIMICA ACIDA  
EN AGAR DE Gracilaria lemaneiformis"

T E S I S  
QUE PRESENTA:  
TOMAS RAMON FLORVILLE ALEJANDRE

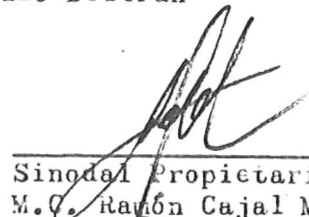
Aprobada por:



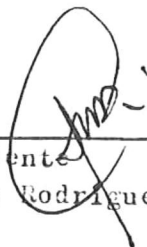
Presidente del Jurado  
Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán



Sinodal Propietario  
Quím. Irma E. Soria Mercado



Sinodal Propietario  
M.C. Ramón Cajal Medrano



Sinodal Suplente  
I.Q. Armando Rodríguez Pinal



Sinodal Suplente  
Dr. Héctor Rivera Carro

## D E D I C A T O R I A

Con mucho amor y agradecimiento a mis queridos padres:

Dr. Tomás Ramón Florville Andrade

Lic. Eglantina Alejandre de Florville

Por su apoyo, paciencia y comprensión.

Con amor:

A mi dulce abuela y a mis hermanos.

Con cariño y gratitud para:

Sra. Olga Moreno

Por sus atenciones.

Con agradecimiento para:

Ocean. Armando Trasviña Castro

Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán

Q.F.B. Graciela Guerra Rivas

Por sus enseñanzas.

Y con cariño:

A mi Facultad y compañeros.

## A G R A D E C I M I E N T O S

Para los Sinodales de ésta Tesis:

Q.F.B. Eduardo Durazo Beltrán

Quím. Irma Esthela Soria Mercado

M.C. Ramón Cajal Medrano

I.Q. Armando Rodríguez Pinal

Dr. Héctor Rivera Carro

Por haber revisado y examinado con gran interés el presente Trabajo.

## C O N T E N I D O

1	INTRODUCCION	1
1.1	Antecedentes	6
1.2	Objetivo	8
2	MATERIALES Y METODOS	9
2.1	Descripción del organismo bajo estudio	9
2.2	Localización del área de recolección de especímenes	9
2.3	Recolección e identificación de especímenes	9
2.4	Secado, Molido y Almacenado	11
2.5	Análisis Proximal	11
2.5.1	Humedad	11
2.5.2	Cenizas	11
2.5.3	Lípidos	11
2.5.4	Proteínas	11
2.5.5	Fibra Cruda	12
2.5.6	Carbhidratos	12
2.6	Análisis Químico	12
2.6.1	Extracción de Agar	12
2.6.2	Azúcares Reductores	13
2.6.3	3,6-Anhidrogalactosa	13
2.6.4	Sulfatos	14
2.7	Hidrólisis Química	14
2.7.1	Material Reductor	14
2.7.2	Material Reductor Terminal	15
2.7.3	3,6-Anhidrogalactosa	15
3	RESULTADOS	16
3.1	Análisis Proximal	16
3.2	Análisis Químico	17
3.3	Hidrólisis Química	20
3.3.1	Material Reductor	20
3.3.1.1	Gráficas de los Datos de Material Reductor	29
3.3.2	Material Reductor Terminal	32
3.3.2.1	Gráfica de los Datos de Material Reductor Terminal	32
3.3.3	3,6-Anhidrogalactosa	34
4	DISCUSION	35
5	CONCLUSIONES	40
6	RECOMENDACIONES	40
7	BIBLIOGRAFIA	42

## CONTENIDO DE TABLAS Y FIGURAS

## TABLAS

TABLA I	Análisis Proximal en base seca de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	16
TABLA II	Análisis Químico del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	17
TABLA III	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 95-96°C durante 5 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	20
TABLA IV	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 95-96°C durante 10 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	21
TABLA V	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 95-96°C durante 15 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	21
TABLA VI	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 95-96°C durante 20 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	22
TABLA VII	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 95-96°C durante 25 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	22
TABLA VIII	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 100-101°C durante 5 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	23
TABLA IX	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 100-101°C durante 10 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	24
TABLA X	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 100-101°C durante 15 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	24
TABLA XI	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 100-101°C durante 20 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	25
TABLA XII	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 100-101°C durante 25 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	25

TABLA XIII	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 110-112 <sup>o</sup> C durante 5 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	26
TABLA XIV	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 110-112 <sup>o</sup> C durante 10 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	27
TABLA XV	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 110-112 <sup>o</sup> C durante 15 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	27
TABLA XVI	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 110-112 <sup>o</sup> C durante 20 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	28
TABLA XVII	Contenido de Material Reductor en hidrolizados a 110-112 <sup>o</sup> C durante 25 horas del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	28
TABLA XVIII	Contenido de Material Reductor Terminal en hidrolizados con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N a 110-112 <sup>o</sup> C del agar de <u>Gracilaria lemaneiformis</u> .	

## FIGURAS

FIGURA 1	Estructura Química del Acido Levulínico.	3
FIGURA 2	Formación de Derivados Furfurílicos a partir de Hexosas	4
FIGURA 3	Localización del Área de Recolección de Especímenes.	10
FIGURA 4	Curva de Calibración de Material Reductor.	18
FIGURA 5	Curva de Calibración de 3,6-Anhidrogalactosa.	18
FIGURA 6	Curva de Calibración de Sulfatos.	19
FIGURA 7	Curva de Calibración de Material Reductor Terminal.	19

FIGURA 8	Contenido de Material Reductor vs. Tiempo de hidrolizados tratados a 95-96 <sup>o</sup> C.	30
FIGURA 9	Contenido de Material Reductor vs. Tiempo de hidrolizados tratados a 100-101 <sup>o</sup> C.	31
FIGURA 10	Contenido de Material Reductor vs. Tiempo de hidrolizados tratados a 110-112 <sup>o</sup> C.	31
FIGURA 11	Contenido de Material Reductor Terminal en hidrolizados tratados con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1N a 110-112 <sup>o</sup> C.	33

Actualmente la subsistencia de los laboratorios de producción e investigación en acuicultura se basa principalmente en la disponibilidad de dietas artificiales (alimento inerte) y la producción de los eslabones bajos de la cadena alimenticia (alimento vivo) con el fin de aportar alimento a los organismos superiores que son las especies de importancia protéica y comercial (Paniagua, 1985).

Como ejemplo de tal tipo de dietas se pueden citar las reportadas por los siguientes autores:

Torres (1985) quien encontró el mejor crecimiento en peces de agua dulce al alimentarlos con una combinación de harina de pescado, harina de trigo y vitaminas.

Huet (1973) que menciona entre algunos de los ingredientes que han sido utilizados para alimento de la carpa a los siguientes: semilla de algodón, harina de pescado y almeja, polvo de carne y artemia, papa, harina de trigo y cebada principalmente.

Castellanos (1982) que alimentó al camarón azul (Penaeus stylirostris) con una dieta artificial cuyos principales ingredientes son: harina de trigo, de camarón y de pescado, así como soya, calcio y vitaminas.

En general, la formulación de las dietas acuiculturales está constituida por alimentos de consumo humano por lo que es necesario explorar fuentes alternativas, como las algas ricas en carbohidratos y minerales, que no interfieran con la nutrición humana.

Los carbohidratos son los nutrimentos más abundantes y baratos que se encuentran en la Naturaleza. En las especies del reino vegetal se sintetizan por el proceso de fotosíntesis y son los principales componentes almacenadores de la energía radiante del Sol. La mayoría de los compuestos orgánicos que se encuentran en las plantas y los animales son derivados de carbohidratos, y aún la misma síntesis de proteínas se lleva a cabo a través de aminoácidos que se generan de la reacción entre carbohidratos y compuestos nitrogenados (Badui, 1984).

Según Tressler (1940) los carbohidratos presentes en algas comestibles forman aproximadamente dos terceras partes del contenido de materia seca de éstas.

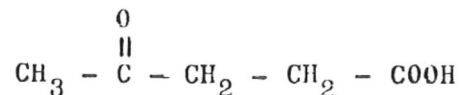
Anteriormente se pensaba (Tressler, 1940; Chapman, 1950) que los carbohidratos algales sólo podían ser utilizados en pequeñas proporciones por el hombre y los animales, pero actualmente existe controversia a éste respecto. Bardach, et al. (1972) reporta que en algunos criaderos de Filipinas el alga roja Gracilaria spp. ha reemplazado a otros vegetales comunmente utilizados como alimento del sábalo (Chanos chanos), mostrando ser mucho más nutritiva que estos al mejorar el crecimiento del mismo y aumentar el número de cosechas. Por otra parte, Cooper (1977) señala que estudios recientes en el organismo humano muestran que éste modifica su tracto digestivo aumentando nuevas enzimas y flora intestinal, de tal manera que al poco tiempo de estarse consumiendo éste nuevo alimento la eficiencia digestiva aumenta.

Jensen (1972) señala que conforme las prácticas y técnicas de la agricultura mejoraron y los métodos modernos de alimentación fueron ganando terreno, las algas fueron forzadas a salir de la dieta humana. Por consiguiente, puede pensarse en las algas marinas como materia prima con función energética en la elaboración de dietas para consumo animal que no interferirían con la nutrición del hombre.

Todas las algas contienen carbohidratos en forma de polisacáridos (Cooper, 1977). Al hidrolizarlos estos son fragmentados obteniéndose así polímeros de menor longitud o bien azúcares libres que tal vez entrarían a rutas metabólicas con mayor rapidez y, por tanto, podrían favorecer el desarrollo de organismos alimentados con dietas que incluyan estos hidrolizados.

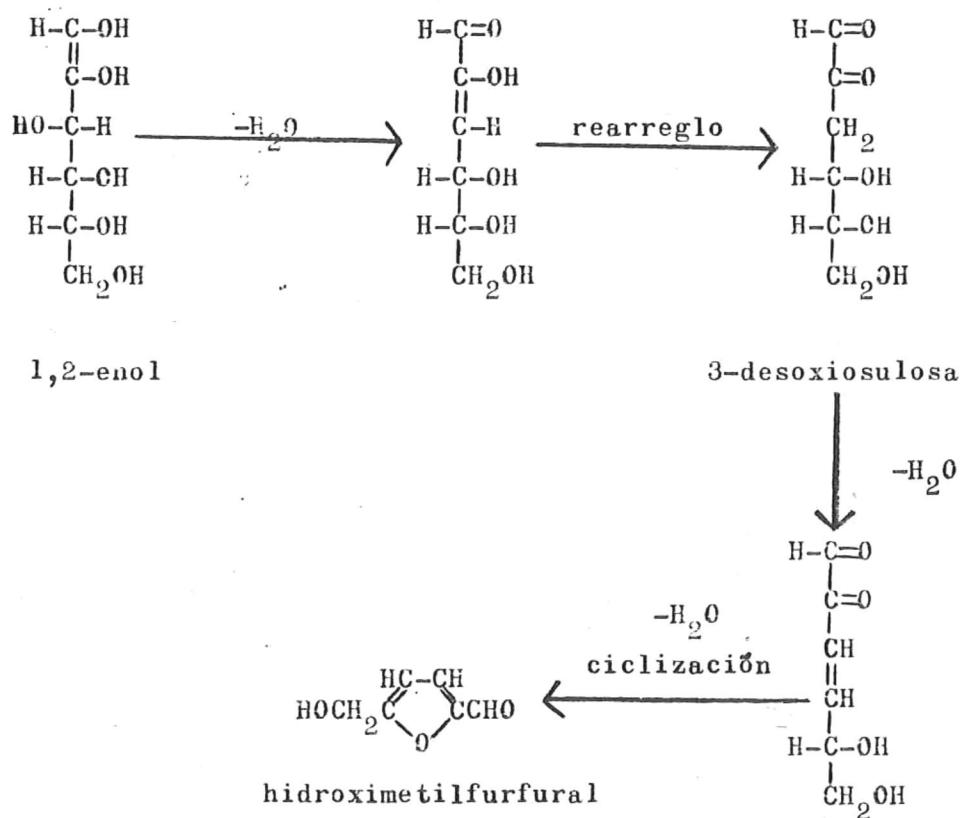
La hidrólisis química de polisacáridos algales generalmente se efectúa utilizando ácidos inorgánicos en caliente (Hong et al., 1969; Craigie y Leigh, 1978; Nadin, 1978; Zanolungo, 1980) los cuales causan hidrólisis de los enlaces glucosídicos. La facilidad y el grado de hidrólisis depende de varios factores; del pH del sistema, del tipo de enlace glucosídico, del tipo de monosacárido, y de la presencia de grupos voluminosos en el polímero que impidan el ataque del ácido. Las furanosas son mucho más sensibles a los ácidos que las piranosas. La presencia de grupos sulfato en los carbohidratos estabiliza los enlaces glucosídicos. Los azúcares anhidros como la 3,6-anhidrogalactosa son sumamente lábiles y aceleran la hidrólisis de los polisacáridos que los contienen. Los productos de la hidrólisis ácida de los polisacáridos, como son algunas hexosas, pueden a su vez reaccionar con los ácidos formando derivados furánicos, como el hidroximetilfurfural, que puede posteriormente descomponerse y formar otros compuestos como el ácido levulínico y el ácido fórmico (Badui, 1984).

De acuerdo con Murillo (1952) el ácido levulínico o ácido  $\gamma$ -cetovaleriánico se forma en grandes cantidades calentando las hexosas con ácido clorhídrico concentrado y su estructura química (Murillo, 1952; Hodge y Osman, 1976; Morrison y Boyd, 1980; Fessenden y Fessenden, 1982) se presenta en la Figura 1.



Estructura Química del Acido Levulínico  
Figura 1

Las reacciones de deshidratación por ácido y la producción de derivados furánicos se inician con la formación del correspondiente enol del monosacárido, de donde se producen diferentes intermediarios derivados de la 3-desoxiosulosa. La deshidratación de los enoles se lleva a cabo a través de reacciones de  $\beta$ eliminación como se muestra en la Figura 2, y los derivados furfúricos se forman por una reacción de ciclización de las moléculas deshidratadas (Badi, 1984). En los sistemas ácidos la enolización de los azúcares es lenta, las reacciones de deshidratación rápidas y no son afectadas por oxidación del aire, los azúcares no se fragmentan por lo que los productos finales son pocos (Hodge y Osman, 1976).



Formación de Derivados Furfúricos a partir de Hexosas

Figura 2

Consecuentemente, la hidrólisis de polisacáridos puede ser aplicada a la solución de problemas acuiculturales, por lo que surge la necesidad de realizar estudios que aporten información sobre este tema.

## 1.1 ANTECEDENTES

En la revisión bibliográfica realizada no fué posible localizar estudios semejantes al presentado en éste trabajo. No obstante, se revisaron varios estudios que efectúan hidrólisis química de agar cuyo objetivo se dirige hacia la determinación de la estructura y composición química del ficocoloide; sin embargo, ninguno de ellos menciona específicamente porque causa se eligen tales condiciones de hidrólisis.

Entre los estudios revisados, y cuyas condiciones hidrolíticas se tomaron como pauta para la realización del presente trabajo, se encuentran los siguientes:

Hong, et al. (1969) que en la determinación de los principales componentes del agar de 6 especies de Gracilaria efectuó hidrólisis con HCl 1N a 100°C durante 20 horas.

Craigie y Leigh (1978) que proponen como condiciones convenientes para hidrólisis química de agares y carragenanos a las siguientes: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5N durante 4 horas a 100°C.

Nadin (1978) que al caracterizar los azúcares constituyentes de Annfeltia plicata y su agar efectuó hidrólisis con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 5 durante 6 horas.

Selvendran, et al. (1979) que señala que la hidrólisis química total de polisacáridos que contienen aldosas tales como glucanos, arabinosilanos y galactomananos se puede lograr mediante: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 ó 1.0 M a 100°C durante 4-6 horas.

Zanlungo (1980) que determinó la composición química del agar de Gelidium linguatum mediante la hidrólisis a reflujo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N

durante 14 horas.

Craigie, et al. (1984) que en la determinación de los azúcares constituyentes del agar de 4 especies de Gracilaria efectuaron hidrólisis química bajo las condiciones siguientes:  $H_2SO_4$  o ácido trifluoroacético 2N a  $100^{\circ}C$  durante 2 horas.

## 1.2 OBJETIVO

Determinar mediante pruebas químicas el comportamiento en medio ácido de agar extraído del alga roja Gracilaria lemaneiformis, y establecer las condiciones de hidrólisis máxima considerando como índice de hidrólisis al poder reductor.

### 2.1 DESCRIPCION DEL ORGANISMO BAJO ESTUDIO

Gracilaria es un alga marina perteneciente a la división Rhodophyta, clase Rhodophyceae, subclase Florideophyceae, orden Gigartinales, familia Gracilariaceae.

Posee unas 150 especies descritas en la zona mesolitoral e infralitoral de regiones templadas, tropicales y antárticas (Yamada, 1976). Debido a la suavidad y elasticidad de sus geles especies de Gracilaria son utilizadas en la industria de los alimentos (Yaphe, y Duckworth, 1972).

Estudios en especies de Gracilaria indican que su composición química general (Whyte y Englar, 1980) y la de su agar (Izumi, 1972; Duckworth et al., 1971; Hong et al. 1969) es: materia seca: 12-18%; cenizas totales: 22-38%; proteínas: 8-12%; agar: 11-17% (conteniendo galactosa, 3,6-anhidrogallactosa, metil galactosa, ácidos urónicos y grupos sulfato).

### 2.2 LOCALIZACION DEL AREA DE RECOLECCION DE ESPECIMENES

Gracilaria lemaneiformis se colectó el 26 de octubre de 1985 en Bahía de los Angeles, B.C. . El área de colecta se determinó de acuerdo a la distribución que presenta el recurso, el cual se extiende desde los 0 metros hasta los 10 metros de profundidad; ésta área se localiza entre las latitudes  $28^{\circ}57' N$  y  $28^{\circ}59' N$  y las longitudes  $113^{\circ}32' W$  y  $113^{\circ}34' W$ , en la parte norte de la Bahía (Figura 3).

### 2.3 RECOLECCION E IDENTIFICACION DE ESPECIMENES

Todos los especímenes fueron colectados e identificados por la

Sección Botánica Marina del Proyecto: "Alternativas de Nutrición en el Cultivo de Organismos Acuáticos" de la Facultad de Ciencias Marinas de la Universidad Autónoma de Baja California.

Como método de muestreo se eligió el de tipo estratificado al azar debido al gradiente de profundidad, y se trazaron 11 transectos orientados a  $60^{\circ}$  respecto al Norte con separaciones de 200 metros entre cada uno de ellos (Figura 3). El tamaño mínimo de muestra se determinó siguiendo la metodología propuesta por Brower y Zar (1979); y para determinar el tamaño de arte se utilizó el índice de dispersión de Morisita (1969).

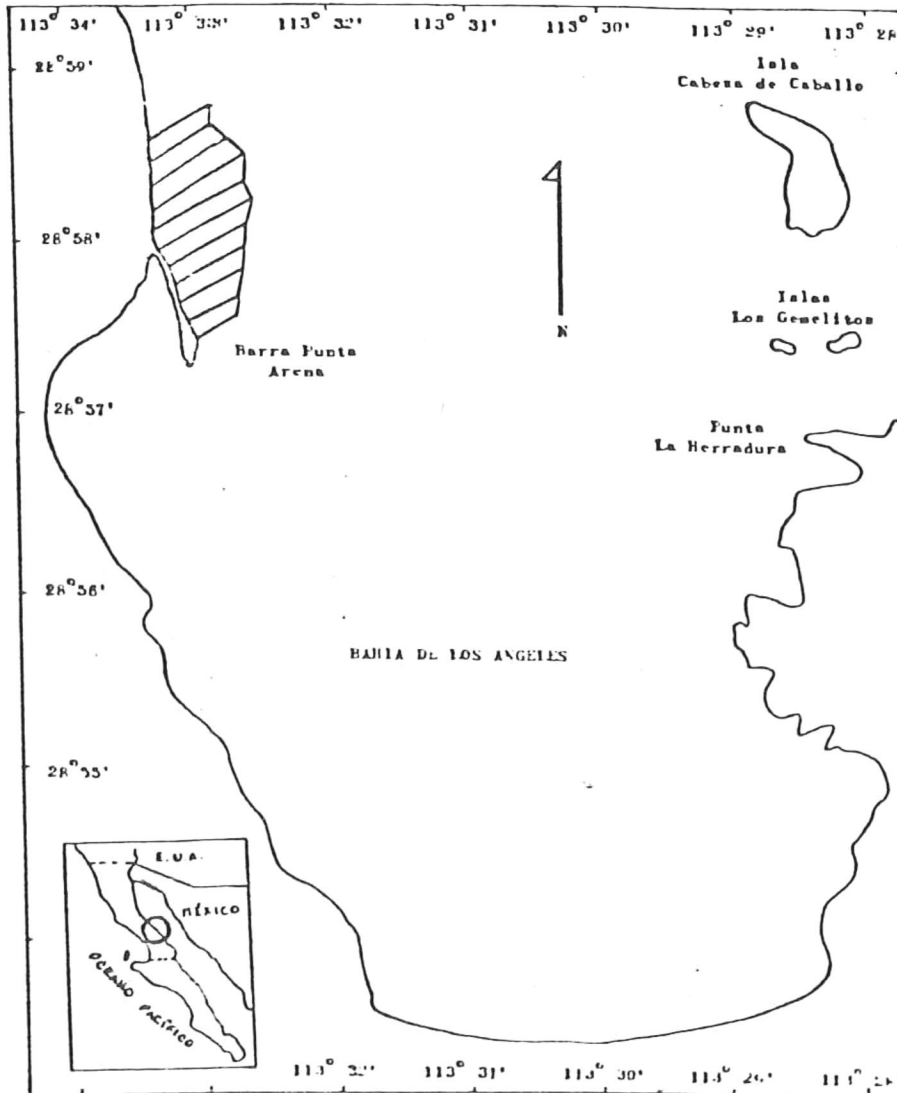


FIGURA 3. LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES.

## 2.4 SECADO, MOLIDO Y ALMACENADO

Las algas fueron secadas al Sol y en estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  por espacio de 48 horas; posteriormente fueron molidas finamente en molino Wiley con malla de tamizado de 0.5 mm. Una vez hecho esto se almacenaron en recipientes de polietileno.

## 2.5 ANALISIS PROXIMAL

Todas las determinaciones del análisis proximal se realizaron en base al peso seco del alga de acuerdo a los métodos descritos por la A.O.A.C. (1975).

### 2.5.1 HUMEDAD

Fué considerada como la pérdida en peso de la muestra al ser sometida a  $100-110^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas.

### 2.5.2 CENIZAS

Fueron consideradas como el material obtenido después de calcinación del alga seca a  $500-550^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas.

### 2.5.3 LIPIDOS

Se determinaron mediante extracción de la muestra durante 8 horas con éter etílico como solvente en aparato extractor Soxhlet. Los lípidos fueron cuantificados por diferencia entre los pesos inicial y final (anterior y posterior a la extracción) del matraz receptor después de evaporar el disolvente.

### 2.5.4 PROTEINAS

Su determinación se realizó de acuerdo al método Micro-Kjeldhal,

el cual consiste en tratar la muestra a elevadas temperaturas con  $H_2SO_4$  concentrado en presencia de  $K_2SO_4$  y  $CuSO_4$  como mezcla catalítica. Los compuestos nitrogenados son así descompuestos con formación de amoníaco, el cual es fijado por el ácido en forma de ión amonio. El digerido se alcaliniza fuertemente con NaOH y se calienta a ebullición; el amoníaco que destila es absorbido en una disolución de  $H_3BO_3$  al 4% en exceso y el ión borato formado es valorado con HCl .01N. El ácido consumido es equivalente al amoníaco obtenido y al contenido de nitrógeno en la muestra. El contenido protéico se obtiene mediante la multiplicación del porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25.

#### 2.5.5 FIBRA CRUDA

El método consiste en determinar la fracción de polisacáridos no digerible, para lo cual la muestra se mantiene a reflujo con una solución ácida durante 30 minutos y posteriormente con una solución alcalina durante el mismo período de tiempo. Después se somete a una temperatura de  $110^{\circ}C$  por 24 horas en una estufa y por 6 horas a  $550^{\circ}C$  en una mafla. El contenido de fibra se obtiene por diferencia de pesos.

#### 2.5.6 CARBOHIDRATOS

Fueron calculados por diferencia entre el 100% y la suma de los porcentajes de cenizas, lípidos, proteínas y fibra cruda.

### 2.6 ANALISIS QUIMICO

#### 2.6.1 EXTRACCION DE AGAR

Se realizó tomando como referencia los métodos descritos por Fraigie y Leigh (1978) y Zanlungo (1980). El alga seca y molida

(10 g.) fué agitada con agua destilada (500ml.) a 95°C durante 1 hora y media. La mezcla fué filtrada en caliente y el proceso de extracción repetido tres veces más. El gel resultante se cortó en trozos pequeños, se congeló a -5°C y después se descongeló; éste proceso se repitió dos veces más. El agar seco se obtuvo con lavados de acetona y para su secado final se colocó en estufa a 40°C hasta peso constante.

### 2.6.2 AZUCARES REDUCTORES

Fueron determinados de acuerdo al método de Dubois, et al., (1956). Para la curva de calibración se utilizó galactosa a concentraciones de 5 - 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (Figura 4) que, por acción de una solución acuosa de fenol al 5% en presencia de ácido sulfúrico concentrado formó, al igual que formaría cualquier azúcar simple o sustancia relativa con grupos reductores libres o potencialmente libres, un cromóforo amarillo-naranja que se leyó en espectrofotómetro UV-VIS (Coleman Junior) a 485 nm. Las muestras problema fueron soluciones acuosas con 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . de agar.

### 2.6.3 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Se determinó de acuerdo al método descrito por Yaphe y Arsenault, (1965). Como estándar de referencia para la curva de calibración se utilizó fructosa a concentraciones de 5 a 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (Figura 5). El método está basado en la formación de un cromóforo color rosa oscuro por la reacción entre 3,6-anhidrogalactosa y resorcinol en presencia de acetal en medio ácido. La absorbancia fué medida en espectrofotómetro UV-VIS (Coleman Junior) a 550 nm. La cantidad de 3,6-anhidrogalactosa se determinó multiplicando el valor obtenido por el factor 1.087, ya que el color dado por D-fructosa es 92% el de una concentración equimolecular de 3,6-anhidrogalactosa. La muestra problema fué una solución de agar conteniendo 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

#### 2.6.4 SULFATOS

Fueron determinados de acuerdo al método descrito por Jackson y Mc Candless, (1978). La curva patrón se elaboró utilizando como estándar de referencia sulfato de potasio a concentraciones de 8 a 40  $\mu\text{g/ml}$ . (Figura 6). El método consiste en determinar el contenido de sulfato inorgánico en la muestra precipitándolo con cloruro de bario en presencia de ácido tricloroacético. El precipitado fué mantenido en suspensión con una solución diluída de agarosa y la turbidez del mismo fué medida en espectrofotómetro UV-VIS (Coleman Junior) a 500 nm. La muestra problema fué una solución de agar conteniendo 1.4  $\text{mg/ml}$ .

#### 2.7 HIDROLISIS QUIMICA

Se efectuaron 90 hidrólisis (por duplicado) en la forma siguiente: 30 a 95-96°C, 30 a 100-101°C y 30 a 110-112°C. Para cada temperatura se varió el tiempo de hidrólisis a intervalos de 5 horas, con un tiempo mínimo de 5 horas y un máximo de 25 horas. Para cada tiempo se hicieron 6 hidrólisis variando en cada una de ellas la concentración de ácido sulfúrico a intervalos de 0.25N, con una concentración mínima de 0.25N y una máxima de 1.5N. Las muestras para hidrólisis fueron preparadas a partir de una solución de agar con una concentración de 60  $\mu\text{g/ml}$ . De ésta se tomó 1 ml. y se mezcló en tubos de ensaye con rosca con 1 ml. de solución de ácido sulfúrico con el doble de concentración de la requerida. Inmediatamente se cerraron y se colocaron en estufa (previamente calentada) a la temperatura de hidrólisis.

##### 2.7.1 MATERIAL REDUCTOR

Al cumplirse los tiempos de hidrólisis los hidrolizados fueron sacados de la estufa, enfriados con agua corriente y de inmediato se determinó a cada uno el contenido de material reductor de acuerdo al punto 2.6.2.

### 2.7.2 MATERIAL REDUCTOR TERMINAL

Fué determinado de acuerdo al método modificado de Nelson (1944). Se elaboró una curva de calibración de 10 a 40  $\mu\text{g}$  (Figura 7) utilizando galactosa como estándar de referencia. El método se fundamenta en la reacción del azúcar con una solución alcalina de tartrato de cobre la cual genera óxido cuproso que reacciona con arsenomolibdato para dar una coloración azul intenso debida a la formación de azul de metileno. La absorbancia del cromóforo obtenido fué medida en espectrofotómetro UV-VIS (Coleman Junior) a 520 nm. El método se aplicó al hidrolizado tratado bajo las siguientes condiciones:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N a 110-112°C. Las muestras problema fueron preparadas a partir de una solución de agar con una concentración de 1 mg/ml. De ésta se tomó 0.5 ml y se mezcló en tubos de ensaye con rosca con 0.5 ml de ácido sulfúrico 2N. Los tubos fueron cerrados inmediatamente y colocados en estufa (previamente calentada) a 110-112°C. Al cumplirse los tiempos de hidrólisis los hidrolizados fueron sacados de la estufa, enfriados con agua corriente, neutralizados y acto seguido se determinó (por duplicado) el contenido de material reductor terminal a cada uno de ellos.

### 2.7.3 3,6-ANHIDROGALACTOSA

Al hidrolizado tratado bajo las siguientes condiciones:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N, 110-112°C durante 5 horas, se determinó el contenido de 3,6-anhidrogalactosa de acuerdo al punto 2.6.3. La muestra problema se trató (previamente al análisis) en forma análoga a la descrita en el punto 2.7, pero su preparación fué a partir de una solución de agar con 1.4 mg/ml. Para eliminar la absorbancia del ácido sulfúrico 1N se aplicó la determinación a una muestra de éste y la absorbancia medida se restó a la absorbancia del hidrolizado.

## 3.1 ANALISIS PROXIMAL

La Tabla I presenta los porcentajes de Cenizas, Lípidos, Proteínas, Fibra Cruda y Carbohidratos en base seca de Gracilaria lemaneiformis.

TABLA I. ANALISIS PROXIMAL EN BASE SECA DE  
Gracilaria lemaneiformis

% CENIZAS	30.35
% LIPIDOS	1.77
% PROTEINAS	28.53
% FIBRA CRUDA	0.66
% CARBOHIDRATOS	38.69

## 3.2 ANALISIS QUIMICO

La Tabla II muestra los resultados obtenidos en el análisis químico del agar de Gracilaria lemaneiformis.

El contenido de Carbohidratos Reductores, 3,6-Anhidrogalactosa, y Sulfatos fueron determinados a partir de las curvas de calibración de las Figuras 4, 5 y 6.

TABLA II. ANALISIS QUIMICO DEL AGAR DE  
Gracilaria lemaneiformis

% RENDIMIENTO	35.8
% CARBOHIDRATOS REDUCTORES	65.0
% 3,6-ANHIDRO- GALACTOSA	89.7
% SULFATOS	1.6

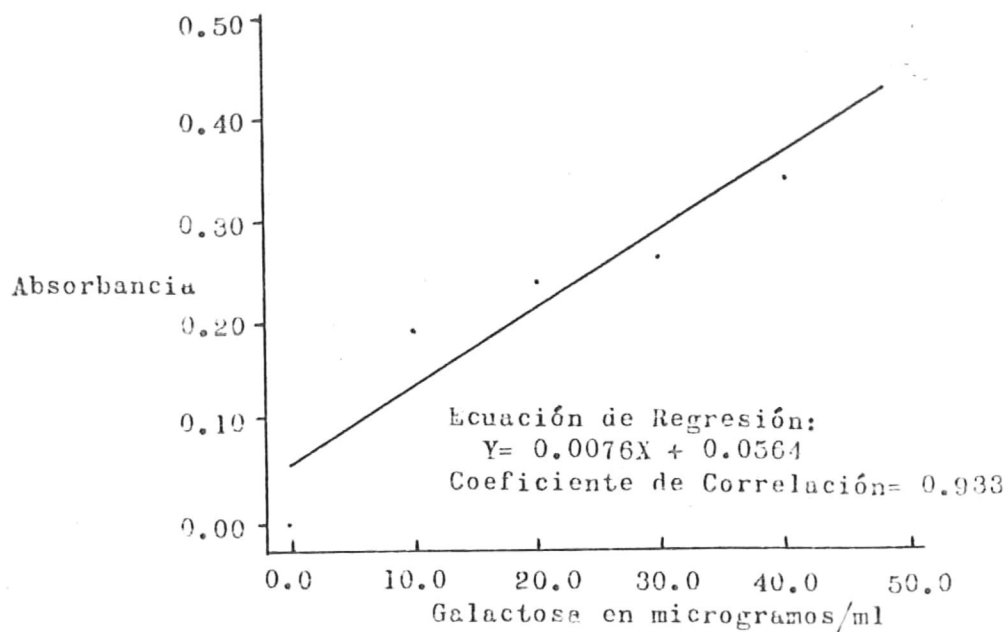


FIG. 4 CURVA DE CALIBRACION DE MATERIAL REDUCTOR

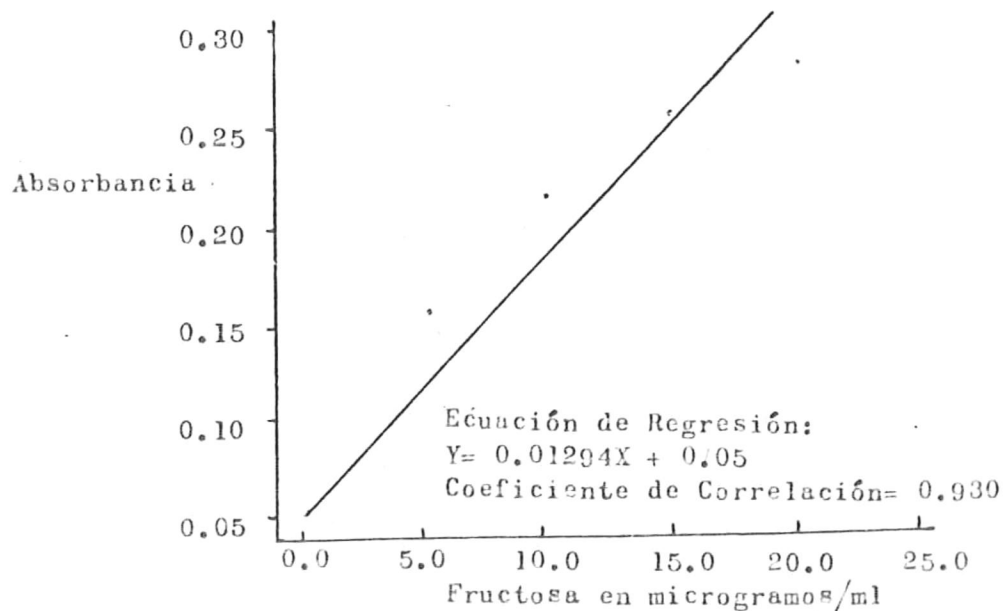


FIG. 5 CURVA DE CALIBRACION DE 3,6-ANHIDROGALACTOSA

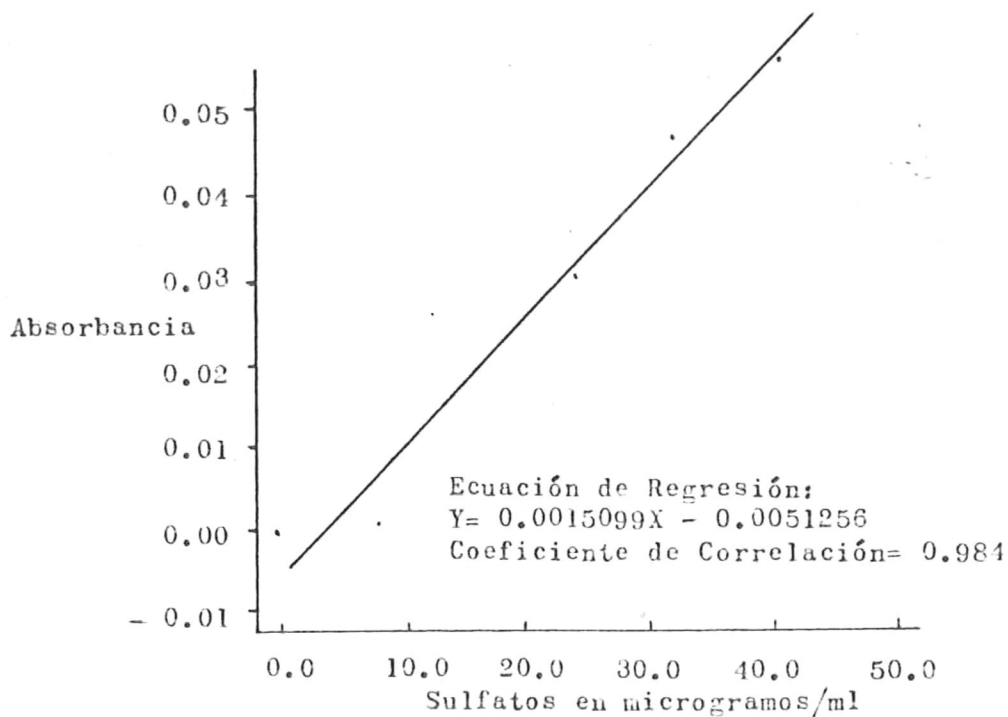
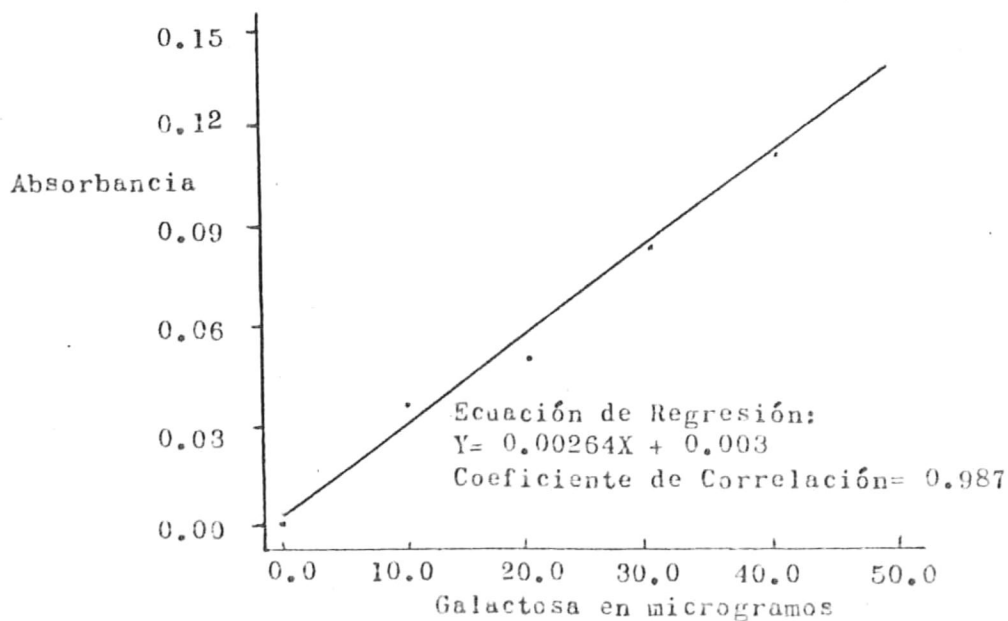


FIG. 6 CURVA DE CALIBRACION DE SULFATOS



. FIG. 7 CURVA DE CALIBRACION DE MATERIAL REDUCTOR TERMINAL

### 3.3 HIDROLISIS QUIMICA

#### 3.3.1 MATERIAL REDUCTOR

Las Tablas III a XVII presentan los resultados obtenidos en la determinación de material reductor en hidrolizados a 95-96°C, 100-101°C y 110-112°C del agar de Gracilaria lemaneiformis.

El contenido de material reductor en los hidrolizados fué obtenido a partir de la curva de calibración de la Figura 4.

El contenido de material reductor en  $\mu\text{g}/\text{ml}$  presentado en las Tablas III a XVII, corresponde al contenido de material reductor en 30  $\mu\text{g}$  de agar (ya que ésta fué la cantidad de muestra analizada por ml; ver punto 2.7). El contenido de material reductor en  $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$  de agar es la expresión en porcentaje de los contenidos correspondientes en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

TABLA III. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 95-96°C DURANTE 5 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[\text{H}_2\text{SO}_4] \text{ N}$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de agar)
0.25	17.9	59.6
0.5	14.5	48.3
0.75	14.0	46.6
1.0	26.7	89.0
1.25	10.2	34.0
1.5	10.4	34.6

TABLA IV. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 95-96°C DURANTE 10 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]_N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g/ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de agar)
0.25	9.4	31.4
0.5	2.8	9.3
0.75	2.5	8.3
1.0	15.3	51.0
1.25	3.8	12.6
1.5	0.2	0.7

TABLA V. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 95-96°C DURANTE 15 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]_N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g/ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de agar)
0.25	12.8	42.6
0.5	12.0	40.0
0.75	7.0	23.3
1.0	24.0	80.0
1.25	5.6	18.6
1.5	6.2	20.6

TABLA VI. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 95-96°C DURANTE 20 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g/ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de agar)
0.25	15.6	52.0
0.5	11.2	37.3
0.75	8.3	27.6
1.0	22.5	75.0
1.25	4.2	14.0
1.5	4.8	16.0

TABLA VII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 95-96°C DURANTE 25 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g/ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ de agar)
0.25	10.6	35.3
0.5	4.9	16.3
0.75	10.8	36.0
1.0	24.1	86.3
1.25	5.0	16.6
1.5	3.0	10.0

Como se observa en las Tablas III a VII los mayores contenidos de material reductor en los hidrolizados a 95-96°C del agar de Gracilaria lemaneiformis se obtuvieron utilizando  $H_2SO_4$  1N. Los valores máximos para todas las concentraciones de ácido se alcanzaron a las 5 horas de hidrólisis (ver Tabla III) y los mínimos después de 10 horas (ver Tabla IV). El mayor contenido de material reductor fué de 89.0% y el menor de 0.7%.

TABLA VIII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 100-101°C DURANTE 5 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]_N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	17.7	59.0
0.5	16.3	54.3
0.75	14.9	49.6
1.0	28.6	95.3
1.25	8.1	27.0
1.5	7.8	26.0

TABLA IX. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 100-101°C DURANTE 10 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	14.4	48.0
0.5	6.5	21.6
0.75	7.5	25.0
1.0	21.6	72.0
1.25	4.5	15.0
1.5	4.0	13.3

TABLA X. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 100-101°C DURANTE 15 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	12.9	43.0
0.5	11.3	37.6
0.75	8.2	27.3
1.0	21.7	72.3
1.25	7.1	23.6
1.5	8.1	27.0

TABLA XI. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 100-101°C  
DURANTE 20 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g / ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g / 100 \mu g$ de agar)
0.25	16.6	55.3
0.5	12.8	42.6
0.75	9.9	33.0
1.0	23.3	77.6
1.25	5.6	18.6
1.5	7.3	24.3

TABLA XII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 100-101°C  
DURANTE 25 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g / ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g / 100 \mu g$ de agar)
0.25	9.4	31.3
0.5	6.9	23.0
0.75	8.5	28.3
1.0	20.2	67.3
1.25	6.3	21.0
1.5	5.7	19.0

De acuerdo a los resultados mostrados en las Tablas VIII a XII se puede observar que los mayores contenidos de material reductor en los hidrolizados a 100-101°C del agar de Gracilaria lemaneiformis se obtuvieron en los hidrolizados con  $H_2SO_4$  1N. Todas las concentraciones de ácido alcanzaron sus valores máximos después de 5 horas de hidrólisis (ver Tabla VIII), excepto el ácido sulfúrico 1.5N que lo mostró 20 horas más tarde; los valores mínimos se presentaron después de 10 horas en los hidrolizados con  $H_2SO_4$  0.5, 0.75, 1.25 y 1.5N, y a las 25 horas en aquellos con  $H_2SO_4$  0.25 y 1.0N (ver Tablas IX y XII). El mayor contenido de material reductor fué de 95.3% y el menor de 13.3%.

TABLA XIII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 110-112°C DURANTE 5 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	23.1	77.0
0.5	18.5	61.6
0.75	14.5	48.3
1.0	29.9	99.9
1.25	11.7	39.0
1.5	12.8	42.6

TABLA XIV. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 110-112°C  
DURANTE 10 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml.$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	16.2	54.0
0.5	14.9	49.6
0.75	5.8	19.3
1.0	25.0	83.3
1.25	8.8	29.3
1.5	8.1	27.0

TABLA XV. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 110-112°C  
DURANTE 15 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$[H_2SO_4]^N$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/ml.$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
0.25	11.7	39.0
0.5	7.7	25.6
0.75	5.6	18.6
1.0	16.3	54.3
1.25	4.9	16.3
1.5	4.4	14.6

TABLA XVI. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 110-112°C DURANTE 20 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$\left[ \text{H}_2\text{SO}_4 \right] \text{N}$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de agar)
0.25	14.1	47.0
0.5	9.0	30.0
0.75	8.8	29.3
1.0	20.0	66.6
1.25	3.7	12.3
1.5	4.0	13.3

TABLA XVII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR EN HIDROLIZADOS A 110-112°C DURANTE 25 HORAS DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

$\left[ \text{H}_2\text{SO}_4 \right] \text{N}$	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	MATERIAL REDUCTOR ( $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ de agar)
0.25	7.0	23.3
0.5	11.2	37.3
0.75	8.6	28.6
1.0	18.6	62.0
1.25	5.0	16.6
1.5	5.3	17.6

Como muestran las Tablas XIII a XVII los mayores contenidos de material reductor en los hidrolizados a 110-112°C del agar de Gracilaria lemaneiformis se obtuvieron con  $H_2SO_4$  1N. Los valores máximos se alcanzaron a las 5 horas de hidrólisis (ver Tabla XIII) y los mínimos a las 15 horas, excepto en aquellos hidrolizados con  $H_2SO_4$  1.25 y 1.5N que lo alcanzaron 5 horas más tarde (ver Tablas XV y XVI) y con  $H_2SO_4$  0.25N que lo alcanzó a las 25 horas (ver Tabla XVII).

### 3.3.1.1 GRAFICAS DE LOS DATOS DE MATERIAL REDUCTOR

Los resultados obtenidos en la determinación del contenido de material reductor en hidrolizados a 95-96°C, 100-101°C y 110-112°C del agar de Gracilaria lemaneiformis fueron graficados contra el tiempo (Figuras 8,9 y 10) con objeto de apreciarlos en conjunto y, en ésta forma, poder analizar las tendencias seguidas al variar el tiempo, la concentración de ácido y la temperatura de hidrólisis.

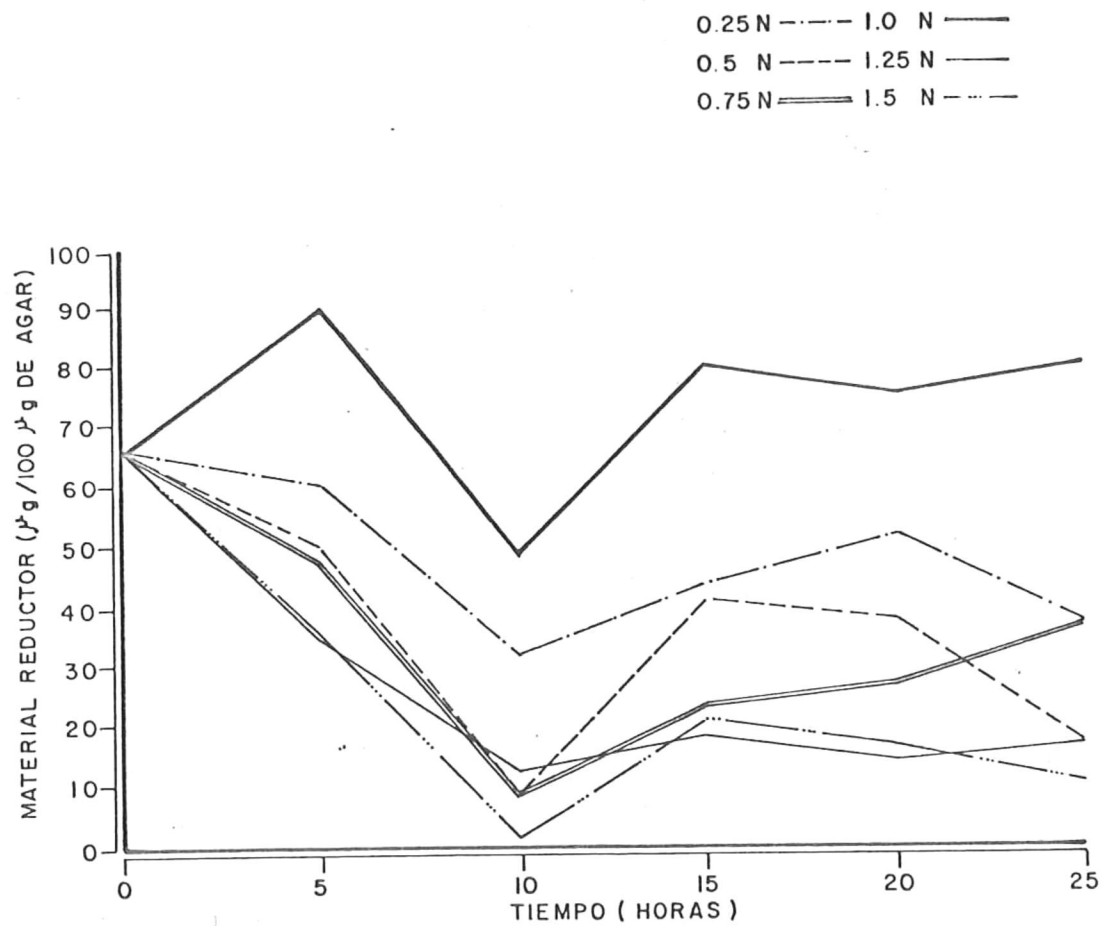


FIG. 8 - CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR VS. TIEMPO DE HIDROLIZADOS TRATADOS A 95-96 ° C .

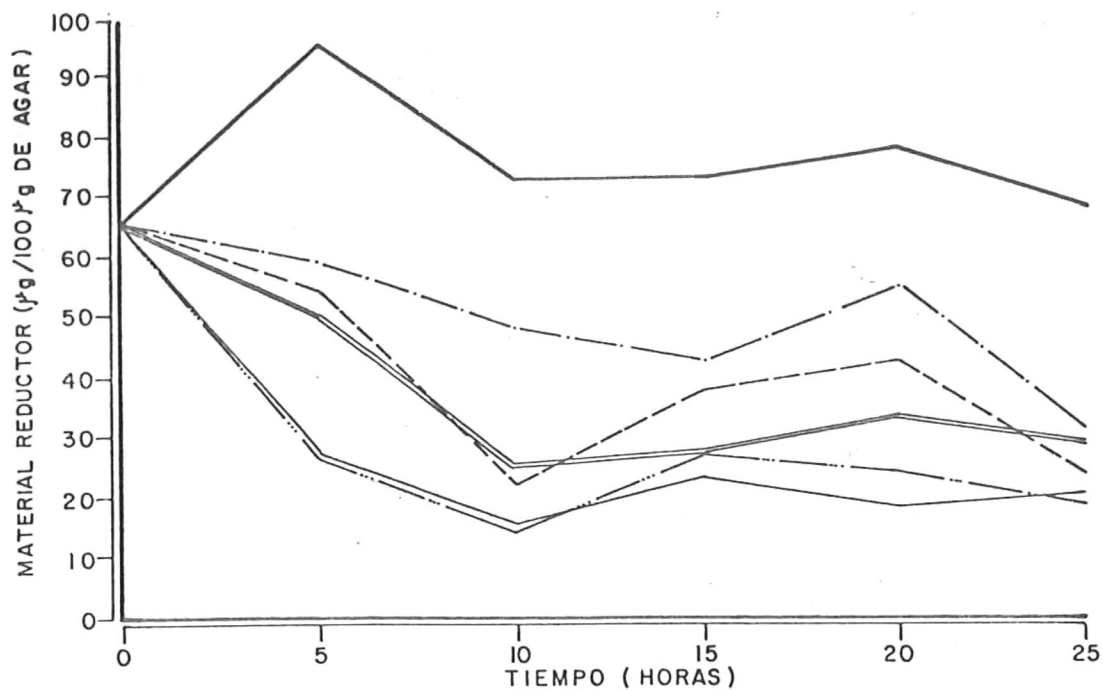


FIG. 9 - CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR VS. TIEMPO DE HIDROLIZADOS TRATADOS A 100-101°C.

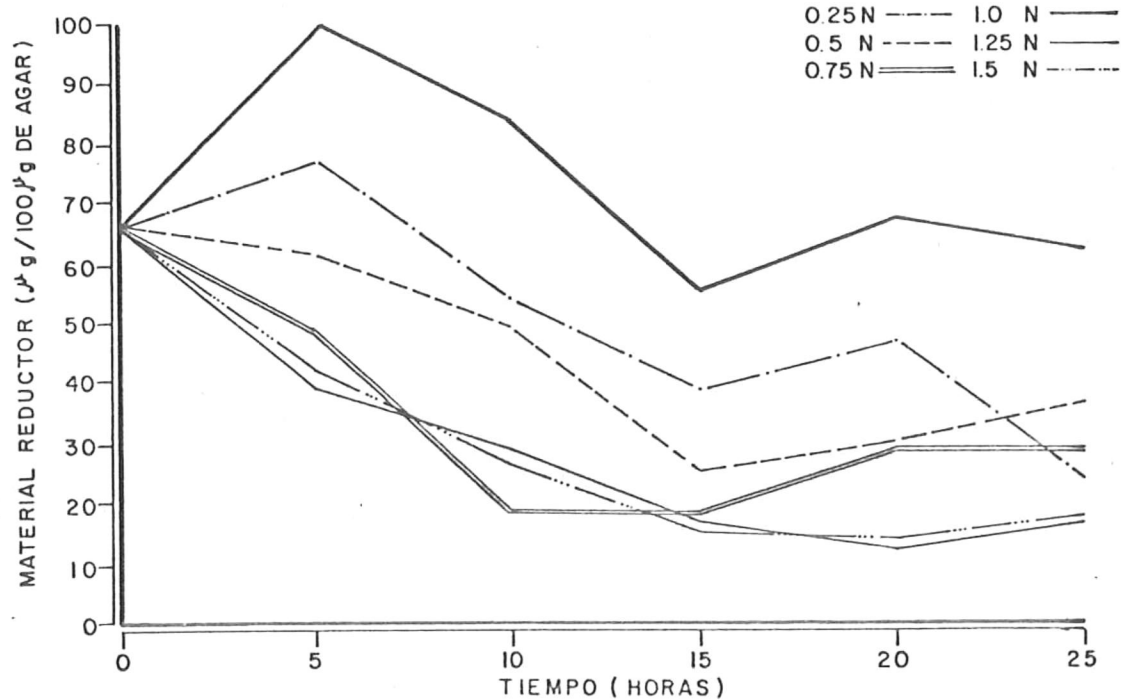


FIG. 10 - CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR VS. TIEMPO DE HIDROLIZADOS TRATADOS A 110-112°C.

### 3.3.2 MATERIAL REDUCTOR TERMINAL

La Tabla XVIII presenta los resultados obtenidos en la determinación del contenido de material reductor terminal en hidrolizados con  $H_2SO_4$  1N a  $110-112^\circ C$ .

El contenido de material reductor terminal en los hidrolizados fué obtenido a partir de la curva de calibración de la Figura 7; su expresión en  $\mu g/100 \mu g$  de agar se obtuvo al dividir entre cinco el valor marcado por la curva de calibración (ya que se analizaron 0.5 ml de muestra conteniendo 1 mg/ml; ver punto 2.7.2).

TABLA XVIII. CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR TERMINAL EN HIDROLIZADOS CON  $H_2SO_4$  1N A  $110-112^\circ C$  DEL AGAR DE Gracilaria lemaneiformis.

TIEMPO (Minutos)* (Horas)	MATERIAL REDUCTOR TERMINAL ( $\mu g/100 \mu g$ de agar)
15*	6.4
5	15.1
10	14.8
15	12.1
20	11.5
25	14.3

#### 3.3.2.1 GRAFICA DE LOS DATOS DE MATERIAL REDUCTOR TERMINAL

Los resultados obtenidos en la determinación del contenido de material reductor terminal en hidrolizados con  $H_2SO_4$  1N a  $110-112^\circ C$  del agar de Gracilaria lemaneiformis fueron graficados contra tiempo (Figura 11) con la finalidad de apreciar su comportamiento al transcurrir éste.

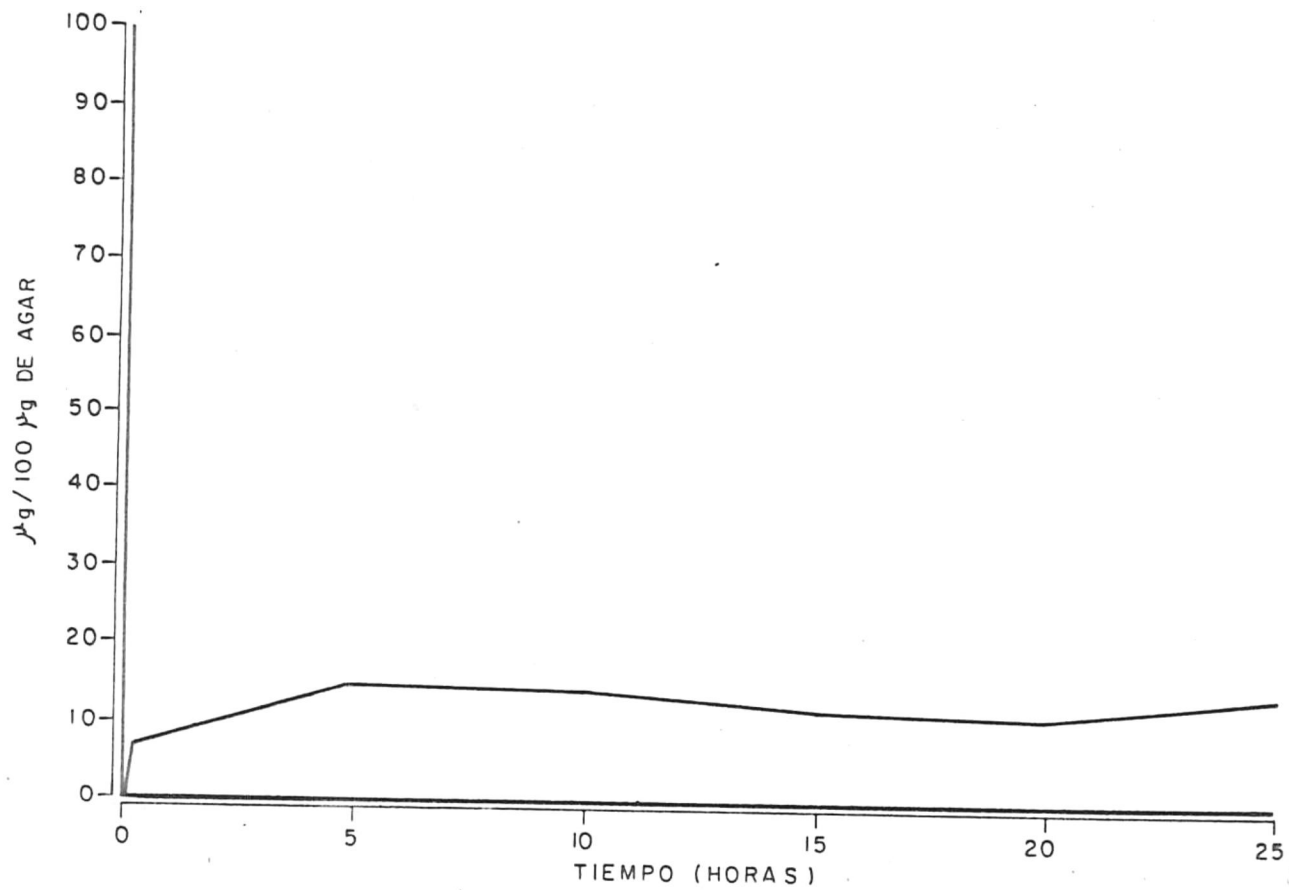


FIG. II - CONTENIDO DE MATERIAL REDUCTOR TERMINAL EN HIDROLIZADOS TRATADOS CON  $H_2SO_4$  1N A 110 - 112 ° C.

### 3.3.3 3,6-ANHIDROGALACTOSA

El contenido de 3,6-anhidrogalactosa se obtuvo a partir de la curva de calibración de la Figura 5.

La absorbancia del hidrolizado (absorbancia corregida) fué obtenida restando la absorbancia del  $H_2SO_4$  1N a la absorbancia medida (absorbancia del hidrolizado + absorbancia del  $H_2SO_4$  1N).

El contenido de 3,6-anhidrogalactosa en el hidrolizado del agar de Gracilaria lemaneiformis tratado bajo las siguientes condiciones:  $H_2SO_4$  1N a  $110-112^{\circ}C$  durante 5 horas, fué de 1.07%.

La naturaleza química general de Gracilaria lemaneiformis se presenta en la Tabla I.

Como era de esperarse el contenido de cenizas es alto. Su valor es casi idéntico al 30.1% reportado por Whyte y Englar (1980) para G. pseudoverrucosa y, a su vez, es menor al 39.42% hallado por Chang Lee (1983) en G. verrucosa.

El contenido de grasas se muestra bajo en comparación con el elevado valor (8.21%) obtenido por Chang Lee (1983) en G. verrucosa, sin embargo es cercano a los valores menores al 1% citados por Hoyle (1975) para varias especies de Gracilaria.

Otro aspecto que merece mención es el elevado contenido protéico del organismo estudiado. Este puede notarse al comparar con los resultados obtenidos por Whyte y Englar (1980) quienes al estudiar la composición química general de cuatro morfotipos de Gracilaria categorizados como chroda, verrucosa, pseudoverrucosa y pseudoverrucosa variant, encontraron valores para el contenido de proteínas en estas algas que oscilaron entre 8 y 12%, y de Chang Lee (1983) que reporta un contenido protéico de 13.53% para G. verrucosa del Estero de Punta Banda.

Respecto al contenido de fibra puede tomarse como referencia el estudio realizado por Ross (1953) quien después de extracción exhaustiva con ácido y alcali de veintiseis algas rojas obtuvo residuos fibrosos insolubles con rendimientos que variaron del 1 al 9% con 4.5% como media, lo cual muestra que el valor obtenido en el presente estudio es bajo.

En cuanto al análisis químico y extracción del ficocoloide se

refiere, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II. A éste respecto es conveniente señalar que el objetivo de tales análisis no fué el de tener bases para establecer la calidad del mismo, sino el de buscar puntos de referencia para los estudios de hidrólisis. Antes de continuar cabe aclarar que, como se observa en las Figuras 4, 5, 6 y 7, la ordenada al origen de las curvas de calibración nunca es igual a cero; un mayor acercamiento a éste valor podría lograrse si la regresión lineal se efectúa utilizando un mayor número de datos experimentales. También es importante señalar que dichas curvas tienen la limitante de que cada punto es el resultado de una sola determinación. No obstante, es posible observar que el contenido de azúcares reductores y de sulfatos se mostró bajo (probablemente debido a la presencia de humedad y/o residuos de fibra en el extracto de agar) respecto a los resultados reportados por Chang Lee (1983) y que el contenido de 3,6-anhidrogalactosa fué sobreestimado ya que éste no es compatible con la estructura química del agar.

El porcentaje de rendimiento en la extracción puede considerarse bueno, ya que es superior al reportado por varios autores que realizaron extracción a presión ambiente (Hoyle, 1978; Whyte y Englar, 1980; Whyte y Englar, 1981) y en autoclave a 121°C y 115 lb. de presión (Chang Lee, 1983) en diferentes especies de Gracilaria.

La estimación del efecto de hidrólisis química fué realizada analizando las tendencias generales seguidas por las curvas mostradas en las Figuras 8, 9, 10 y 11. El análisis se dividió en dos partes: i) Análisis de las curvas de contenido de material reductor total (Figuras 8, 9 y 10); y ii) Análisis de la curva de contenido de material reductor terminal (Figura 11).

i) Análisis de las Curvas de Contenido de Material Reductor Total. Primeramente es conveniente señalar que la información proporcionada por éste tipo de curvas (Figuras 8, 9 y 10) es burda, ya que

los productos generados por el tratamiento hidrolítico inicial son afectados posteriormente por las condiciones necesarias para llevar a cabo la determinación del contenido de material reductor total. Además, como muestran las curvas que describen el comportamiento del contenido de material reductor total respecto al tiempo (Figuras 8, 9 y 10), éste presenta grandes oscilaciones que podrían ser "ruido" provocado por productos de degradación y/o material celulósico remanente en el extracto de agar; sin embargo, para corroborar esto sería necesario realizar estudios que confirmen la presencia de tales compuestos en los hidrolizados (v.gr. CGL, IR, RMN).

No obstante lo anterior, las curvas analizadas describen un comportamiento general en el que destacan las características siguientes:

1) Presencia de los mayores valores de contenido de material reductor total al utilizar  $H_2SO_4$  1N como agente hidrolizante.

2) Presencia de los mayores valores de contenido de material reductor total a las 5 horas de hidrólisis.

3) Tendencia hacia la disminución del contenido de material reductor total al transcurrir el tiempo de hidrólisis.

También es importante señalar que el mayor contenido de material reductor total se presentó a la temperatura de 110-112°C (ver Tabla XIII y Figura 11).

A partir de éste comportamiento se pueden establecer dos hipótesis de trabajo:

1) Al aplicar el Método del Fenol-Sulfúrico se mide el contenido de material reductor total presente en los hidrolizados, el cual depende a su vez del grado de hidrólisis. Por consiguiente, puede

considerarse que la respuesta dada por los hidrolizados a éste método es proporcional al grado de hidrólisis.

2) El contenido de material reductor total presente en los hidrolizados medido por el Método del Fenol-Sulfúrico, no sólo se debe a las condiciones de hidrólisis sino también a otros factores (v. gr. formación de productos de degradación al aplicar éste método que no den respuesta al mismo.); por lo que no es posible relacionar grado de hidrólisis con el contenido de material reductor total.

Atendiendo a la primera de éstas hipótesis y a lo puntualizado respecto al comportamiento general mostrado por las curvas analizadas (Figuras 8, 9, y 10), se proponen como condiciones convenientes para hidrólisis máxima del agar de G. lemaneiformis a las siguientes:  $H_2SO_4$  1N a 110-112°C durante 5 horas.

Considerando como cierta la segunda de éstas hipótesis, se sugiere que en estudios posteriores se utilicen métodos más directos para la determinación del grado de hidrólisis (v.gr. determinación simultánea de material reductor terminal y de viscosidad ).

ii) Análisis de la Curva de Contenido de Material Reductor Terminal. Al aplicar las condiciones de acidez y temperatura propuestas (en base a la primer hipótesis) al agar de Gracilaria lemaneiformis, y determinar el contenido de material reductor terminal al transcurrir el tiempo de hidrólisis se observó lo siguiente (ver Tabla XVIII y Figura 11):

1) La hidrólisis máxima se alcanzó a las 5 horas.

2) Después del punto de hidrólisis máxima el contenido de material reductor terminal se mantuvo aproximadamente constante, lo cual indica que se alcanzó la hidrólisis máxima y ya no es posible hidrolizar más.

3) Al transcurrir el tiempo hay una tendencia hacia la disminu-

ción del contenido de material reductor terminal; ésta puede atribuirse a degradación y alcanza un porcentaje máximo de 23.8 a las 20 horas de hidrólisis.

4) Un elevado porcentaje de la hidrólisis total (42.4%; puesto que 15.1  $\mu\text{g}$  equivalen a 100% de hidrólisis total y 6.4  $\mu\text{g}$  equivalen al 42.4% de hidrólisis total; ver Tabla XVIII) se completó a los 15 minutos de hidrólisis, por lo que es probable que ésta se alcance en un tiempo menor a 5 horas.

Respecto al contenido de 3,6-anhidrogalactosa en el hidrolizado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N a 110-112°C puede decirse que (ver Tabla II y punto 3.3.3) éste es mucho menor (alrededor de 76 veces menor) que el contenido del mismo azúcar en el agar. Si se considera al 3,6-anhidrogalactosa como azúcar guía para monitorear la descomposición del agar bajo tales condiciones de hidrólisis el hecho anterior significaría que únicamente el 1.33% de los azúcares conservarían su estructura química original. A partir de los resultados mostrados en la Tabla XIII y considerando la primer hipótesis planteada en la presente discusión, podrían sugerirse como condiciones alternativas convenientes para disminuir la degradación de los azúcares constituyentes del ficocoloide (conservando una hidrólisis alta) a las siguientes:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.25N a 110-112°C durante 5 horas, ya que la acidez requerida es baja (4 veces menor que la requerida por las condiciones anteriormente mencionadas) y aún se observa un contenido de material reductor total alto (77.0%).

Por último un punto interesante de señalar es el que surge a partir de la gráfica de la Figura 11, en la cual el contenido de material reductor terminal muestra una tendencia de desarrollo exponencial en los primeros períodos de tiempo, lo cual sugiere por comparación con otros estudios (Haug, et al. 1966; Haug, et al. 1967) una cinética de primer orden en la degradación con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1N a 110-112°C del agar estudiado.

Considerando como índice de hidrólisis hipotético al poder reductor, se sugieren como condiciones convenientes para hidrólisis máxima del agar de Gracilaria lemaneiformis a las siguientes:  $H_2SO_4$  1N a 110-112°C durante 5 horas. El contenido de 3,6-anhidrogalactosa en el hidrolizado bajo tales condiciones de hidrólisis es mucho menor que el contenido del mismo azúcar en el agar, por lo que es probable que éstas afecten considerablemente la estructura química de los azúcares constituyentes del ficocoloide. Un elevado porcentaje de la hidrólisis total se completa en los primeros minutos de hidrólisis, por lo que es probable que ésta se alcance en un tiempo menor a 5 horas.

La degradación del agar de Gracilaria lemaneiformis con  $H_2SO_4$  1N a 110-112°C presumiblemente sigue una cinética química de primer orden.

Se recomienda que en investigaciones posteriores se amplíen estos estudios haciendo más fino el análisis mediante la reducción de los intervalos de temperatura, tiempo y acidez; así como realizando análisis que proporcionen información acerca de la naturaleza química de los compuestos presentes en los hidrolizados.

Como condiciones alternativas convenientes para disminuir la degradación del agar manteniendo una hidrólisis alta se recomiendan a las siguientes:  $H_2SO_4$  0.25N a 110-112°C durante 5 horas.

Por otra parte, sería interesante utilizar las condiciones de hidrólisis propuestas en agar destinado a ser fuente energética de

de harinas para consumo animal, y comparar el desarrollo de organismos alimentados con harinas que no contengan al ficocoloide hidrolizado.

- A.O.A.C., 1975. Official Methods of Analysis. 12th. ed. Ass. of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Badui Dergal, S. 1984. Química de los alimentos. 1ra. ed., Alhambra Mexicana, México.
- Ballesteros-Grijalva, G. 1987. Comunicación personal. Facultad de Ciencias Marinas, Apartado Postal # 453, Ensenada, B.C.
- Bardach, J.E., J.H. Ryther y W.O. Mc Larney. 1972. Aquaculture the farming and husbandry of freshwater and marine organisms. Wiley-Interscience, New York.
- Brower, J.E. y J.H. Zar. 1979. Field and laboratory methods for general ecology. En Ballesteros-Grijalva, G. 1986. 3er. Informe del Proyecto: Alternativas de Nutrición en el Cultivo de Organismos Acuáticos. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), Ensenada, B.C. (no publicado).
- Castellanos, J.A. 1982. Estudios experimentales sobre el cultivo del camarón azul (Penaeus stylirostris) en sus etapas de maternidad y preengorda. Tesis Profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), Ensenada, B.C.
- Cooper, M.J. 1977. The sea vegetable book: Foraging and cooking seaweed. CN Potter Books, U.S.A.
- Craigie, J. y C. Leigh. 1978. Carrageenans and agars. En Hellebust, J. y Craigie, J. (ed.), Handbook of phycological methods. Cambridge University Press, New York.

- Craigie, J.S., Z.C. Wen y J.P. van der Meer. 1984. Interspecific, intraspecific and nutritinally-determined variations in the composition of agars from Gracilaria spp. Botánica Marina, vol. XXVII, 55-61.
- Chang-Lee, M.V. 1983. Análisis químico y propiedades físicas de los agares de Gracilaria verrucosa y Pterocladia capillacea. Tesis Profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), Ensenada, B.C.
- Chapman, V.J. 1981 Seaweeds and their uses. 2da. ed., Mathuen & Co. London.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.
- Duckworth, M., K.C. Hong y W. Yaphe. 1971. The agar polisaccharides of Gracilaria species. Carbohyd. Res. 18: 1-9.
- Fessenden, R.J. y J.S. Fessenden. 1982. Química Orgánica. 2da. ed., 2da. reimp., Grupo Editorial Iberoamérica, México.
- Haug, A., B. Larsen y O. Smidsrød. 1966. A study of the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. Acta Chemica Scandinavica, 20: 183-190.
- Haug, A., S. Myklestad, B. Larsen y O. Smidsrød. 1967. Correlation between chemical structure and physical properties of alginates. Acta Chemica Scandinavica, 21: 768-778.
- Hodge, J.E. y E.M. Osman. 1976. Carbohydrates. En Fennema, O.R. (ed.). Food Chemistry. Marcel Dekker, New York.

- Hong, K.C., M.E. Goldstein y W. Yaphe. 1969. A chemical and enzymic analysis of the polisaccharides from Gracilaria. Proc. Intl. Seaweed Symp. 6: 473-482.
- Hoyle, D.M. 1975. The literature pertinent to the red algal genus Gracilaria in Hawaii. Technical Report No.3, 18-29. Marine Agronomy U.S. Sea Grant Program, Hawaii.
- Hoyle, M.D. 1978. Agar studies in two Gracilaria species (G. bursa-pastoris (Gmelin) Silva y G. coronopifolia J. Ag.) from Hawaii. II. Seasonal aspects. Botánica Marina, vol. XXI, 347-352.
- Huet, M.E. 1978. Tratado de Piscicultura. En Paniagua-Michel, J. 1985. Alimentación de larvas de peces, moluscos y crustáceos con alimento elaborado a partir de desechos biodigeridos. Proyecto de Tesis Doctoral.(C.I.C.E.S.E.), Ensenada, B.C.
- Izumi, K. 1972. Chemical heterogeneity of the agar from Gracilaria verrucosa. J. Biochem. 72: 135-140.
- Jackson, S.G. y E.L. McCandless. 1978. Simple rapid turbidimetric determination of inorganic sulfate and/or protein. Anal. Biochem. 90: 802-808.
- Jensen, A. 1972. The nutritive value of seaweed meal for domestic animals. Proc. Intl. Seaweed Symp. 7: 7-11.
- Morisita, M. 1969. Measuring the dispersion of individuals and analysis of distributional patterns. En Ballesteros-Grijalva, G. 1985. 3er. Informe del Proyecto: Alternativas de Nutrición en el Cultivo de Organismos Acuáticos. Facultad de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), Ensenada, B.C. (no publicado).

- Morrison, R.T. y R.N. Boyd. 1980. Química Orgánica. Fondo Educativo Interamericano, México.
- Murillo, H. 1952. Tratado Elemental de Química Orgánica. 2da. ed. corr. y aument., Porrúa, México.
- Nadin, A.O. 1978. Estudio de la composición química de una especie agarífera del litoral argentino Ahnfeltia plicata (Huds.) Fries. (Rhodophyta). Contribución Técnica C.I.B.I.M.A. No.33 23 pp. Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Buenos Aires.
- Nelson, N.J. 1944. Biol. Chem. 153: 375. En Clark, J.M. y R.L. Switzer. Experimental Biochemistry. 2da. ed., W.H. Freeman and Co. San Francisco, 1964.
- Paniagua-Michel, J. 1985. Alimentación de larvas de peces, moluscos y crustáceos con alimento elaborado a partir de desechos biodegradados. Proyecto de Tesis Doctoral. (C.I.C.E.S.E.), Ensenada, B.C.
- Ross, A.G. 1953. J. Sci. Food Agric. 4, 333-335. En Aspinall, G.O. (ed.). The Polisaccharides. vol.II, Cap.4, Academic Press, London. 1983.
- Selvendran, R.R., J.F. March y S.G. Ring. 1979. Anal. Biochem. 96, 282-292. En Aspinall, G.O. (ed.). The Polisaccharides. vol.1, Cap.3, Academic Press, London. 1983.
- Torres-Garza, J.F. 1985. Experimentación de una dieta de bajo costo en peces de agua dulce. Tesis Profesional. Escuela Superior de Ciencias Marinas (U.A.B.C.), Ensenada, B.C.

- Tressler, D.K. 1940. Marine Products of Commerce. Reinhold Publishing Corporation, New York.
- Whyte, J.N.C. y J.R. Englar. 1980. Chemical composition of agars in morphotypes of Gracilaria from British Columbia. Botánica Marina, vol. XXIII, 277-283.
- Whyte, J.N.C. y J.R. Englar. 1981. Agar from an intertidal population of Gracilaria sp. Proc. Intl. Seaweed Symp., 10: 537-542.
- Yamada, N. 1976. Current status and future prospects for harvestin and management of the agarophyte in Japan. J. Fish. Res. Board Can. 33: 1024-1030.
- Yaphe, W. y M. Duckworth. 1972. The relationship between structures and biological properties of agar. Proc. Intl. Seaweed Symp., 7: 15-22.
- Zanlungo, A.B. 1980. Polisaccharides from chilean seaweeds. Part IX. Composition of the agar from Gelidium lingulatum. Botánica Marina, vol. XXIII, 741-743.