

INTRODUCCIÓN



CAPÍTULO II



CLAUDIA MASSIEL PÉREZ GONZÁLEZ

Los vegetales producen diferentes sustancias de naturaleza polisacárida con capacidad de gelificación¹ comúnmente llamados gomas.

Las gomas son moléculas de alto peso molecular con características hidrofílicas o hidrofóbicas que, normalmente tienen propiedades coloidales, con capacidad de producir geles, al combinarse con el solvente apropiado (Paskel 2001). Las gomas, los coloides hidrofílicos (o hidrocoloides), los mucílago, e incluso los polisacáridos solubles en agua, son algunas de las denominaciones dadas a estas sustancias, que tienen función como agentes espesantes o gelificantes, y/o estabilizantes de emulsiones (Delattre et al. 2011).

La industria de los polisacáridos se inició, en las primeras décadas del siglo XX (BeMiller 2009). Desde entonces, el conocimiento de los hidratos de carbono, combinado con las últimas técnicas industriales, ha permitido la producción de gomas o hidrocoloides con una pureza cada vez mayor.

¹ Gelificación del inglés “gelation o gelification” definido como la propiedad de formar geles.

Un grupo importante de gomas lo configura los galactomananos. Estos se obtienen principalmente del endospermo de las semillas de leguminosas, y dan lugar a varios tipos .

La goma locuste o garrofin es extraída de las semillas de la *Ceratonia siliqua*, algarrobo europeo, originario de Siria y Asia Menor, que se ha cultivado desde la antigüedad en la cuenca del Mediterráneo. La goma locuste es soluble a 80-90 °C, forma geles en presencia de otros como kappa carragenano (la cual describiremos más adelante) y/o goma xantana, lo que proporciona importantes ventajas: refuerzo de los geles carragenanos, textura elástica, y prevención de sinéresis (contracción de un gel por exudación de líquido) (Pasquel 2001).

Otra de las gomas es la guar, extraída del endospermo de la semilla de planta *Cyamopsis tetragonolobus* (Manikoth et al. 2012). Es una leguminosa anual, originaria de la India y Pakistán, aunque también se cultiva en Estados Unidos, es conocida por sus propiedades espesantes. Su desarrollo inicial estuvo motivado por la carencia de goma garrofin en los años 40, su producción industrial a gran escala se inició en los años cincuenta (BeMiller 2009).

La goma tara al igual que la guar y locuste, representan los tres galactomananos de mayor importancia comercial tanto en la industria de alimentos y de biopolímeros (Cerqueira et al. 2011). Se obtiene de las semillas de *Caesalpinia spinosa*, distribuida principalmente en América del Sur, siendo Perú el mayor productor.

Otras gomas se obtienen directamente de los exudados de las plantas terrestres, destacando entre ellas los tipos arábica, ghati, karaya y tragacanto.

La arábica, considerada la más vieja y la mejor conocida de todas ellas, es la savia exudada de varias especies de arboles de Acacia (Delattre et al. 2011), como mecanismo de defensa para cerrar heridas y prevenir la entrada de gérmenes. Químicamente está formada por seis monosacáridos: galactosa, ramnosa, arabinopiranososa, arabinofuranosa, ácido glucorónico y ácido 4-O-metilglucurónico, conteniendo además iones de calcio, magnesio y potasio (Pasquel 2001).

La goma ghati o hindú es un exudado amorfo y translúcido del árbol *Anogeisssus latifolia* de la familia Combretaceae, oriundo de la India. Es un polisacárido complejo, soluble en agua, formado por arabinosa, galactosa, manosa, xilosa y ácido glucorónico. El exudado está constituido

por una fracción soluble y otra insoluble, pero gelificable, se utiliza por sus propiedades para emulsionar, estabilizar, producir viscosidad y ligar agua (Pasquel 2001).

La goma karaya, es un exudado seco del árbol *Sterculia urens* producido en el norte y centro de la India. Es un polisacárido complejo parcialmente acetilado, constituido de una cadena principal de unidades de ácido D-galacturónico, L-ramnosa y D-galactosa, de cadenas laterales de ácido D-glucurónico (Galla & Dubasi 2010). La característica fundamental de esta goma es su baja solubilidad en el agua y su fuerte adherencia cuando es utilizada en altas concentraciones. Dadas sus propiedades se utiliza en la preparación de helados, ya que, previene la formación de grandes cristales de hielo y la pérdida de agua.

La goma tragacanto se deriva del exudado de un arbusto del género *Astragalus*, una leguminosa perenne oriunda del Asia menor, de las regiones montañosas y semidesérticas del Irán, Siria y Turquía (Balaghi et al. 2011). Esta goma está constituida por una mezcla de polisacáridos, la tragantina y la basorina. El primero, la tragantina, es soluble y está compuesta por moléculas de L-arabinosa, ácido O-galacturónico, O-galactosa y O-xilosa. La basorina es un polímero insoluble, compuesto de ácidos polimetoxilados. Este polisacárido es

soluble en agua fría, estable al calor, al ácido y es muy emulsionante.

Los procesos microbiológicos y de modificación química de los productos vegetales también favorecen la síntesis de gomas.

Otros polímeros pueden ser obtenidos por la transformación de esos exudados vegetales mediante la acción enzimática de las bacterias. Los géneros de bacterias *Xantomonas* y *Pseudomonas* elaboran gomas con propiedades poco comunes en lo que respecta a la textura. Uno de ellos, la goma xantana, descubierta hace 50 años en Illinois, Estados Unidos, es un polisacárido obtenido como metabolito secundario mediante un proceso de fermentación biotecnológica, basada en el cultivo, en condiciones aerobias de la bacteria *Xantomonas campestris* (Moghaddam et al. 2011). Está constituida por una estructura básica celulósica con ramificaciones de trisacáridos y aún cuando no sea un agente gelificante, en combinación con la goma locuste puede formar geles elásticos y termorreversibles. Es utilizada en muchos productos como espesante, estabilizante y agente para mantener suspensiones.

El escleroglucano es otro polímero natural que se obtiene principalmente de los procesos fermentativos del hongo filamentoso del género *Sclerotium* tales como *S. rofsii* y *S. glucanicum*. Sus notables propiedades reológicas y su

estabilidad en un amplio rango de pH, salinidades y temperaturas, hacen que este polisacárido no iónico neutro, sea adecuado para diferentes aplicaciones técnicas desde recuperación de petróleo hasta la industria alimentaria, aplicaciones médicas y cosméticas (Schmid et al. 2011).

La goma gellan es un agente gelificante relativamente nuevo (1977). Es un polisacárido extracelular producido por fermentación de carbohidratos utilizando *Sphingomonas elodea* (Morris et al. 2012). Es un hidrocoloide multifuncional, con potencial para ser utilizado en una gran variedad de alimentos como gelificante, texturizante, estabilizante, formador de películas, agente estructurante y de suspensión.

Destacan en este grupo, las modificaciones químicas de la celulosa y de la pectina, conducentes a la obtención de hidrocoloídes con propiedades gelificantes.

Las gomas celulósicas son las más usadas de este grupo y forman una familia de productos obtenidos por modificación química de la celulosa, siendo sus ejemplos más importantes compuestos tales como carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa (BeMiller 2009). La carboximetilcelulosa sódica, comúnmente conocida como goma celulósica o CMC, es generalmente utilizada como espesante,

estabilizante, gel, y modificador de las características de flujo de soluciones acuosas o suspensiones. La metilcelulosa (MC) y la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) son las únicas gomas que gelifican con el calor y después, al enfriarse, retornan a su viscosidad original líquida, lo que las hace muy importante para ser utilizadas con alimentos fritos (Pasquel 2001).

Las pectinas funcionan como agentes gelificantes y espesantes en una gran variedad de productos. Es un componente natural de las plantas, especialmente abundante en frutas como la manzana y los cítricos (Yapo 2011). Se une a la celulosa en los tejidos vegetales, donde tiene un papel fundamental en la determinación de sus propiedades mecánicas. La pectina se empezó a fabricar a escala industrial a principios del siglo XX, aunque se ha utilizado tradicionalmente desde hace mucho tiempo para fabricar mermeladas. Hoy en día, se utiliza en aplicaciones tan diversas como el yogur, productos de confitería, y las bebidas lácteas ácidas (Rosenbohm et al. 2003).

Las algas marinas también producen gomas o hidrocoloides. El ácido algínico, el agar y el carragenano son los de mayor importancia comercial.

Los alginatos son sales de ácido algínico, formado por una secuencia de dos ácidos: ácido beta-D manurónico y ácido alfa-L gulurónico (Chee et al. 2011). Se obtienen de las algas pardas y se utilizan en diversas industrias como agentes gelificantes. La producción de alginatos a escala industrial se inició en Estados Unidos en los años 30 (Bixler & Porse 2011), utilizándose en un principio para la fabricación de alimentos enlatados. Hoy en día, los alginatos son usados, frecuentemente, como espesantes, estabilizantes de emulsiones, gelificantes, inhibidores de sinéresis (Hernández-Carmona et al. 1999). Los alginatos, por sus propiedades, son utilizados en diferentes industrias, tales como, de fabricación textil, alimentaria, farmacéutica y sanitaria. En la industria farmacéutica, se emplean para la elaboración de impresiones dentales, taponador de hemorragias, y contribuyen a la cicatrización rápida. En otros procesos relacionados con la encapsulación de grageas y/o cápsulas se utilizan como agente fijador y emulsificador. En la cosmética, se utilizan como estabilizantes de espumas e hidratantes del cabello, como suavizante en jabones, champús y cremas de afeitar. En los procesos biotecnológicos, los alginatos sirven durante la

microencapsulación para la inmovilización de células (Miranda-Medina et al. 2008).

Dentro de las algas pardas (Phaeophyceae), las de mayor importancia comercial son *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum* y *Fucus serratus*, (Fenoradosoa et al. 2010). La producción anual de alginatos a escala mundial es de 22 mil toneladas (tabla II.1), siendo los principales fabricantes Estados Unidos, Gran Bretaña, Francia, y Noruega. Estos países contribuyen con más del 80% de la producción y del consumo mundial (McHugh 2002, Bixler & Porse 2011). Recientemente, se ha iniciado su explotación a baja escala, en países como India y Chile (Miranda-Medina et al. 2008). De manera similar a los exudados de las plantas terrestres, también pueden ser obtenidos de fuentes bacterianas como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cuesta et al. 2005).

El agar es considerado como uno de los agentes gelificantes más importantes. Este polisacárido, constituido de galactosa y anhidrogalactosa, forma geles a concentraciones tan bajas de 0.04% (peso seco) (Pasquel 2001). Sus propiedades gelificantes, la resistencia térmica de sus geles y la marcada diferencia entre sus temperaturas de gelificación y de fusión, hacen de este ficocoloide muy útil para la industria.

Fue el primer ficocoloide utilizado en la industria para el consumo humano (Arvizu-Higuera et al. 2008).

El agar se obtiene a partir de algas rojas de la clase Florideophyceae, siendo las más importantes los géneros de Gelidium y Gracilaria. La fuente original de agar procedía de las especies de Gelidium de Japón. Sin embargo, la escasez de este polímero registrada durante la segunda guerra mundial impulsó la búsqueda de otras fuentes de esta materia prima (Buschmann et al. 2001). De esta manera, se comprobó que las especies de Gracilaria eran adecuadas si se trataban previamente con un álcali.

El agar de mejor calidad, el cual genera un tipo de gel más concentrado, es el derivado de Gelidium, pero solo puede obtenerse de especies silvestres; Gelidium es un alga de pequeño tamaño que posee una tasa de crecimiento baja y los intentos por cultivarla no han sido comercialmente viables (Friedlander 2008).

La demanda de Gelidium es siempre elevada, siendo los principales países proveedores España, Portugal, Marruecos, Japón, República de Corea, China, Chile y Sudáfrica (Melo 1998).

Por su parte, las especies de Gracilaria están constituidas por especímenes de mayor tamaño, cultivándose

con éxito en sistemas de cultivo. En la actualidad constituyen la principal fuente de agar, aproximadamente en un 65 % (McHugh 2002). El cultivo de *Gracilaria* ha prosperado especialmente en Chile e Indonesia, pero existen poblaciones de estas algas, tanto silvestres como cultivadas, en Argentina, Perú, Filipinas, China y Vietnam (Bixler & Porse 2011).

Otras fuentes secundarias de materia prima para la producción de agar son las especies de *Pterocladia* (una alga roja de tamaño entre 3-4 cm similar a *Gelidium*, que se recolecta en las Azores y Nueva Zelandia) (Chiovitti et al. 2004) y *Gelidiella* en países como India, Egipto y Madagascar (Prasad et al. 2006).

Según datos de la FAO (McHugh 2002), se extraen 55 000 toneladas (peso seco) de algas marinas con las que se producen 7 500 toneladas de agar por un valor de 132 millones de dólares (tabla II.1). De los aproximadamente 30 productores de agar reconocidos, EE.UU, Chile, España, y Japón producen el 60 por ciento del total, estimándose no obstante otra veintena de productores a menor escala. Sin embargo, casi una década después, dos países son líderes en esta industria, Chile e Indonesia los cuales, entre ambos, generan el 38% de la producción actual, lo que equivale a un valor de 3 600 toneladas por año (Bixler & Porse 2011). La distribución

geográfica de la producción de agar a comienzos de la década del 2000 y a finales de la misma ha decaído en regiones como en Europa y África, y aumentado en regiones de América y Asia-Pacífico (Bixler & Porse 2011).

Tabla II.1 Volumen de ventas, precios y valor de ventas de los hidrocoloides marinos en la última década (Fuente: Bixler & Porse 2011).

Hidrocoloides Marinos	Volumen de ventas		de Media de precios		de Valor de ventas	
	(t)		US\$kg ⁻¹		Millón US\$	
	1999	2009	1999	2009	1999	2009
Agar	7,500	9,600	17	18	128	173
Alginatos	23,000	26,500	9	12	225	318
Carragenanos	42,000	50,000	7	10.5	291	527
Total	72,500	86,100	-	-	644	1,018

El carragenano es otro ficocoloide parecido al agar, que genera un mayor volumen de ventas.

El carragenano es otro hidrocoloide producido por las macroalgas marinas, que a diferencia de los alginatos se obtiene de las especies de algas rojas, fundamentalmente de

los géneros *Gigartina*, *Chondrus*, *Euchema*, *Kappaphycus* e *Hypnea*.

La etimología u origen de la palabra carragenano procede del inglés *carrageenan* y hace referencia al nombre coloquial que en Irlanda recibe el alga roja *Chondrus crispus* "carrageen": En este sentido cabe mencionar, que las extracciones acuosas de algas rojas para obtener coloides hidrófilos se conocen en Irlanda desde 1810 (Campo et al. 2009). La primera extracción a nivel comercial fue realizada en 1862 por la compañía británica farmacéutica Stanford, llamado inicialmente *carrageenin* (Pereira et al. 2009a).

El carragenano recibe numerosas acepciones y así se describe en español como carragenano (Stortz 1995), carragenina (Barrios 2005), carragenato (Costell et al. 2000), carragenana (Pasquel 2001) o carragena (Batista 2009).

El carragenano se localiza en la pared y en la matriz intercelular de las algas. Es un polisacárido de alto peso molecular con un contenido de éster sulfato entre 15% y 40%, formado por unidades alternadas de D-galactosa y 3,6-anhidro-galactosa (3,6-AG) ensambladas por enlaces α -1,3 y β -1,4-glucosídico (Lobban & Harrison 1997).

Los carragenanos comerciales se clasifican en tres tipos principales: kappa (k), iota (i) y lambda (λ) carragenano

(Ackloo et al. 2001; Götz et al. 2004; van de Velde 2008). Los diferentes números y posiciones de los grupos sulfato, junto con la presencia o ausencia de la forma 3,6-anhidro de las uniones 4- α -D-galactosa, permite teóricamente 42 estructuras diferentes de disacáridos entre las cuales solo 15 han sido identificadas como galactanos de procedencia algal y asignadas con letras griegas (Lahaye 2001).

Químicamente kappa-carragenano consiste en la repetición de unidades de residuos de disacáridos de 3- β -D-galactopiranososa-4-sulfato y 4-3,6 anhidro- α -D-galactopiranososa. Mientras ι -carragenano consiste en la repetición de unidades de residuos de disacáridos de 3- β -D-galactopiranososa-4-sulfato y 4-3,6 anhidro- α -D-galactopiranososa-2-sulfato (Aguilan et al. 2003). Lambda presenta la unidades de 3- β -D-galactopiranososa-4-sulfato y 4- α -D-galactopiranososa 2,6 disulfato. Basado en la nomenclatura de IUPAC (de sus siglas en inglés, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) kappa carragenano es carragenano 4'-sulfato (G4S-DA), iota carragenano es carragenano 2,4'-disulfato (G4S-DA2S) y lambda es carragenano 2,6,2'-trisulfato (G2S-D2S,6S) (Campos et al. 2009) (Fig. II.1).

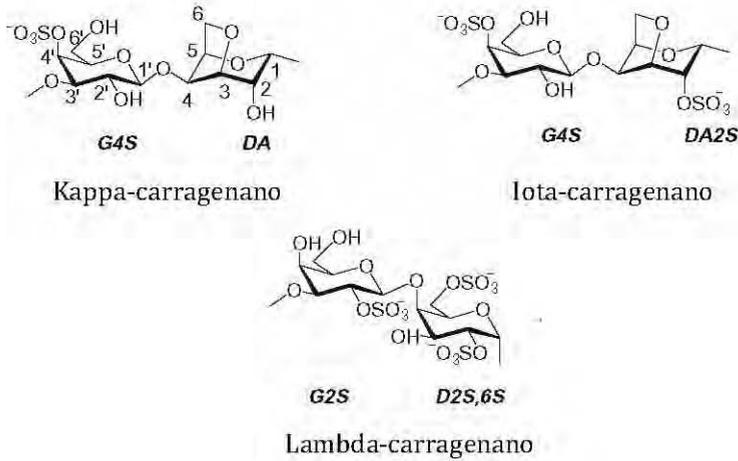


Fig. II.1 Estructura química de los principales carragenanos kappa, iota y lambda. (Fuente: Campo et al. 2009).

Kappa e iota carragenano son moléculas diferentes en sus estructuras y propiedades químicas, debido a ello, tienen diferentes usos en la industria, basándose en la capacidad de formar geles (Lobban & Harrison 1997). Los geles kappa son firmes, quebradizos y exudativos, mientras que, por el contrario los geles iota son más elásticos, resistentes y secos (Wakibia et al. 2006). Las propiedades del gel y viscosidad del carragenano tienen importancia comercial, como agentes aglutinantes, gelificantes, estabilizantes y espesantes en alimentos, cosméticos, farmacéutica, e industrias textiles (Webber et al. 2012). La industria alimenticia reporta un uso

entre 70-80 % de la producción total mundial, estimado sobre 45 000 toneladas métricas por año, de los cuales sobre el 45% son destinados como productos diarios y 30% para carne y sus derivados (Bixler & Porse 2011).

El carragenano también es utilizado como estabilizador en la preparación de pastas dentales o para la absorción de fluidos por el cuerpo, cuando son formulados en vendajes de heridas. La interacción de esta molécula con el caroteno humano, imprime suavidad en la piel, en cabellos, o en lociones de manos y champús, respectivamente (Turan & Neori 2010). En la industria farmacéutica, este polímero ha sido probado como excipiente de tabletas debido a la buena compatibilidad, alta dureza y viscoelasticidad persistente de la tableta durante la compresión. Esta interesante propiedad indica que el carragenano es un adecuado excipiente para las formulaciones de liberación prolongada (Campo et al. 2009). Dentro de otras aplicaciones farmacéuticas incluye la suspensión en sulfato de Bario y antibióticos. También tiene un gran potencial como microbicida tópico, que bloquean los virus de transmisión sexual, tales como, el VIH, el virus del papiloma humano, y herpes (Wang et al. 2007). Una preparación especial es usada en Francia para la terapia de úlceras. En la industria, se utiliza también como agente suspendido para abrasivos, cristales y pinturas(Tye 1989).

El mercado total del carragenano ha sido estimado en 500 millones de dólares anuales (Bixler & Porse 2011) (tabla II.1). En general pueden distinguirse dos tipos de carragenanos: el carragenano refinado y el semi-refinado llamado también PNG (Crado o Calidad Filipina Natural) o PES (Bixler & Porse 2011). Los carragenanos refinados son aquellos en que el carragenano es extraído del material algal filtrado y posteriormente precipitado de la solución acuosa en la que se encuentra. La precipitación se hace generalmente con solventes orgánicos como alcoholes o en solución acuosa y el residuo del alga es removido por filtración (McHugh 2003).

Por el contrario, en la modalidad semi-refinada, el carragenano se obtiene mediante un proceso simple, donde la materia soluble se disuelve en solución alcalina y agua, dejando solo el carragenano y otro material insoluble. Este residuo insoluble está conformado en gran parte de carragenano y celulosa, el cual se comercializa en este estado (Hayashi et al. 2007a). De acuerdo a la empresa manufacturadora Cargill Texturizing Solutions (Fig. II.2), el carragenano semirefinado o PES difiere principalmente del carragenano refinado en tres aspectos, i) la única materia prima para la producción del PES es el alga *Eucheuma*, ii) el carragenano semirefinado se obtiene bajo un tratamiento alcalino simple (sin extracción ni filtración) y iii) el producto resultante se caracteriza por tener un gel más turbio debido a la

presencia de celulosa, una textura brillante debido al alto contenido de la fracción kappa y para llegar a una solubilización completa requiere más tiempo de cocción o más temperatura.

La producción industrial de carragenano refinada consta de tres etapas principales: extracción en condiciones alcalinas; purificación, separando el ficocoloide de las impurezas insolubles y, la recuperación del carragenano por precipitación en alcohol o gelificación del filtrado por adición de cloruro de potasio, secado y triturado.



Fig. II.2. Proceso de extracción a nivel industrial de los carragenanos refinados. Fuente: Cargill Texturizing Solutions (http://www.cargilltexturizing.es/products/hydrocolloids/carrageenans/cts_prod_hydro_car_man_es.shtml).

Características del carragenano del género Kappaphycus.

Las algas conocidas comercialmente como "cottonii" pertenecen al género Kappaphycus (Santos 1989). El término "cottonii" significa que estas algas solo producen kappa carragenano. Los miembros de este género en general

producen kappa carragenano, con dureza de gel mayores de 1000 g cm⁻² reportadas por Santos (1989). Sin embargo Rui y colaboradores (1990) reportaron valores de dureza de gel de 25 g cm⁻² en cultivos en mar abierto y hasta 70 g cm⁻² en cultivos en tanques de *K. alvarezii*. Otro estudio similar realizado por Hurtado-Ponce 1995 reportaron valores desde 1 hasta 131 g cm⁻² según el morfotipo (pardo, rojo, verde) .

En cuanto al contenido de sulfato, Santos (1989) reportó porcentajes entre un 24 y 27 porciento. Otro estudio similar realizado por Hurtado-Ponce (1995) obtuvo valores entre 15 y 20 % entre los morfotipos verde, rojo y pardo. En muestras de *K. alvarezii* de Brasil, Hayashi y colaboradores (2007a) han reportado valores de 23 a 33 %.

En Kappaphycus se han reportado contenidos de 3,6 anhidrogalactosa, Santos (1989) obtuvo porcentajes entre 29 y 32 porciento para *K. alvarezii*, *K. striatum*, *K. procrusteanum* y *K. cottonii*. En este sentido, Aguilan y colaboradores (2003) reportaron valores entre 45 y 47 % en las especies de Filipinas *K. alvarezii*, *K. cottonii* y *K. sp. Sacol* . Sin embargo, en *K. alvarezii* de Brasil han sido reportados vaolres entre 7 y 24 % en función del morfotipo estudiado en pardas de 7-8, rojo 11-12 y verde 21-24 (Hayashi et al. 2007a).

Como hemos descrito en la bibliografía, las propiedades de los kappa carragenos varían a pesar de tratarse del mismo

género y en muchos casos de la misma especie, debido a que principalmente a las condiciones del ambiente como luz, movimiento de las corrientes, nutrientes (Wakibia et al. 2006)

Diferentes métodos de análisis estructurales de los ficocoloides nos permiten conocer en detalle sus propiedades de pureza, cantidad y calidad tales como los colorimétricos, cromatográficos, espectrométricos y espectroscópicos.

En general, varios métodos colorimétricos han sido desarrollados específicamente para la determinación de los polianiones sulfatados (Campos et al. 2009 y referencias contenidas). Básicamente, los métodos colorimétricos se basan en el uso de algún tinte catiónico, que se complementa de forma dinámica con los polianiones. Todos los métodos colorimétricos son sensibles al grado de sulfatación, por consiguiente, son útiles para distinguir el tipo de carragenano que se analiza, es decir si es kappa, iota o lambda, en respuesta al grado de sulfatación.

Otros métodos colorimétricos requieren de tratamientos previos, tales como enzimáticos o simple hidrólisis ácida, y son utilizados para identificar y cuantificar grupos sustituyentes de

sulfato y piruvato por colorimetría, turbidimetría o HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución) (Craigie & Leigh 1978).

Entre los métodos cromatográficos utilizados está la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Ambos procesos requieren la hidrólisis previa del polisacárido en el caso de GC y de la metanólisis en el caso de HPLC.

En general, para el análisis por GC, los polisacáridos primero se hidrolizan y luego los monosacáridos resultantes, son reducidos en alditoles u oxidados (para eliminar el centro anomérico), seguido de su conversión en componentes volátiles. Ambos pasos, hidrólisis de los polisacáridos y la reducción de sus constituyentes monosacáridos en sus correspondientes alditoles deben ser cuidadosamente evaluados a fin de optimizar el análisis con respecto a la fiabilidad, reproducibilidad y sensibilidad (Campo et al. 2009 y referencias contenidas).

La combinación de la degradación de ácidos débiles, derivatización de los monosacáridos y la posterior separación por GC puede ser utilizado en el análisis de carragenanos, así como, también en cualquier otra goma de uso industrial.

Para el análisis de polisacáridos con la técnica de HPLC, se requiere como se mencionó previamente un tratamiento previo con metanólisis, y posteriormente, la fase inversa de HPLC, la cual consiste en la aplicación de una fase estacionaria (medio o matriz de soporte) no polar y una fase móvil polar, para la cuantificación de 3,6 anhidrogalactosa dimetilacetilo liberado tanto por carragenano y agar.

Otra técnica cromatográfica se basa en el análisis molecular mediante la cromatografía de tamaño de exclusión (SEC), la cual se demuestra muy apropiada para la caracterización del carragenano, en aspectos como su masa molecular y su distribución, brindándonos información muy importante sobre su composición química, ramificación de sus cadenas y la cinética de las reacciones de degradación. Ha sido una técnica muy utilizada en la industria alimenticia para la determinación de la distribución del peso molecular y como control de calidad de los polisacáridos (Campo et al. 2009 y referencias contenidas).

El análisis de metilación es una técnica aplicada a polisacáridos complejos, que permite la determinación del patrón de sustitución de monómeros aislados. La técnica consiste, en la metilación de carragenanos con yoduro de metilo, en un medio básico fuerte, tomando como principio el

método básico desarrollado por Hahomori en 1964 (Campos et al. 2009). El producto metilado es sometido a una reacción de hidrólisis la cual debe facilitar el rompimiento del enlace glucosídico sin de la degradación de los puentes anhídrido de los residuos.

Dentro de los métodos espectrométricos, la espectrometría de masa ha llegado a ser cada vez más importante para el análisis de polisacáridos, del cual podemos obtener una rápida exploración (Campo et al. 2009 y referencias contenidas) y análisis detallado de secuencias, debido a su alta sensibilidad y precisión; un proceso rápido comparado con la RMN y otros métodos cromatográficos (Campo et al. 2009 y referencias contenidas). Sin embargo el análisis de carbohidratos es difícil de analizar debido a su heterogeneidad estructural, sustituyentes lábiles e isomerismo de enlaces. Entre las técnicas de espectrometría de masas podemos mencionar espectrometría de masas de ionización de electrospray (ESI-MS) (Fenn et al. 1989; Ekeberg et al. 2001), nano electrospray (nano-ESI-MS) (Wilm & Mann 1996; Karas et al. 2000, Schmidt et al. 2001) y espectrometría de masa asistida por matriz de desorción de láser/ionización (MALDI-MS) (Karas et al. 1985; Ackloo et al. 2001; Dai et al. 1997; Fukuyama et al. 2002), conocidas como las mejores técnicas empleadas para el análisis de muestras de carragenano.

La técnica Transformada de Fourier ciclotrón de espectrometría de resonancia de masas (FTICR-MS) (Comisarow & Marshall 1974; Park & Lebrilla 2005; Zamfir et al. 2003) determina la masa/carga (m/z) de iones, basándose en la frecuencia de ciclotrón de los iones en un campo magnético fijo. Se utiliza en conjunto con la técnica SORI (irradiación sostenida sin resonancia) la cual es un método CID (disociación inducida por colisión) conocido también como SORI-CID (Harvey 2005). SORI-CID es un método que consiste en una ligera irradiación del ion, fuera su frecuencia de resonancia, causando la aceleración y desaceleración de los iones durante el pulso de radiofrecuencia a presión constante de colisión de gas.

Los métodos espectroscópicos son muy utilizados en el análisis de polisacáridos, debido a que no son degradantes, es decir, la muestra se recupera intacta luego de su análisis, lo cual no ocurre con otros métodos químicos tales como hidrólisis, metilación, y otros (Stortz 1995).

Una de las técnicas de espectroscopía, utilizada para estos análisis, es la de resonancia magnética nuclear (RMN) y que realiza procedimientos no destructivos. Es una técnica simple y precisa para el análisis estructural del agar y carragenano (Rochas et al. 1986 y referencias contenidas), así como, para la determinación de la concentración de grupos

sustituyentes en las moléculas de agar. En particular, RMN de ^1H y ^{13}C son unas de las herramientas estándares para la determinación de la estructura química del carragenano (Campo et al. 2009). Ambas, la ^1H y ^{13}C , permiten caracterizar cualitativa y cuantitativamente el carragenano, favoreciendo ya no solo, la identificación de varias formas de carragenano, sino también, la determinación de proporciones molares y el contenido individual de componentes en la mezcla (Campo et al. 2009).

La técnica de espectroscopía infrarroja (IR) ha sido una herramienta muy útil para el análisis de ficocoloides en la industria.

La espectroscopía infrarroja ha sido la técnica vibracional utilizada con mayor frecuencia para el estudio de la composición química de los ficocoloides. Esta técnica presenta dos principales ventajas: requiere de pequeñas cantidades de muestra (miligramos), y es un método no agresivo con precisión confiable (Pereira et al. 2009a).

El uso de la espectroscopía infrarroja ha sufrido un enorme progreso, en la adquisición y el análisis de los datos, de operaciones matemáticas complejas que involucran a las transformadas de Fourier, y por consiguiente, incrementa la sensibilidad de los equipos. Con esta variante llamada FTIR,

han podido diferenciarse distintos tipos de carragenano (Pereira et al. 2009 a, b; Freile-Pelegriñ et al. 2006) por la presencia o ausencia de bandas características (Stortz 1995).

La radiación IR fue descubierta por William Herschel, a comienzos del siglo XX. Los primeros experimentos, que permitieron medir espectros IR de varios compuestos orgánicos, fueron realizados por Coblentz a principios del siglo XX. El potencial de la espectroscopía IR, en el campo de la química, fue reconocido ya en los años 30 del siglo XX, cuando se construyeron los primeros IR. Las necesidades analíticas asociadas con la producción comercial de goma sintética, estimularon el desarrollo comercial de la espectrometría IR y de estudios básicos en este campo. Hasta los años 60 se utilizaron equipos dispersivos que utilizaban monocromadores de prisma o red.

Un avance considerable se alcanzó con la introducción de la técnica de transformada de Fourier (FTIR). Este procedimiento está basado en el interferómetro de Michelson (desarrollado inicialmente para determinar con exactitud, la velocidad de la luz) y el método del matemático francés Fourier, que permite convertir la información obtenida (interferograma) en un espectro. El método de la transformada de Fourier fue utilizado en un principio por los astrónomos (década de los 50) para aislar señales débiles, procedentes de

estrellas distantes, del ruido de fondo ambiental. El rápido desarrollo de las tecnologías de los láseres y la computación son responsables del predominio actual de los equipos FTIR, haciéndolos rápidos, sensibles, y especialmente exitosos en su combinación con las técnicas cromatográficas.

Los equipos IR se clasifican, de acuerdo con la técnica de medición utilizada, en dispersivos y transformada de Fourier (FTIR). Los equipos IR dispersivos fueron los primeros desarrollados y funcionan sobre la base de la irradiación secuencial de la muestra con radiaciones IR de diferentes frecuencias.

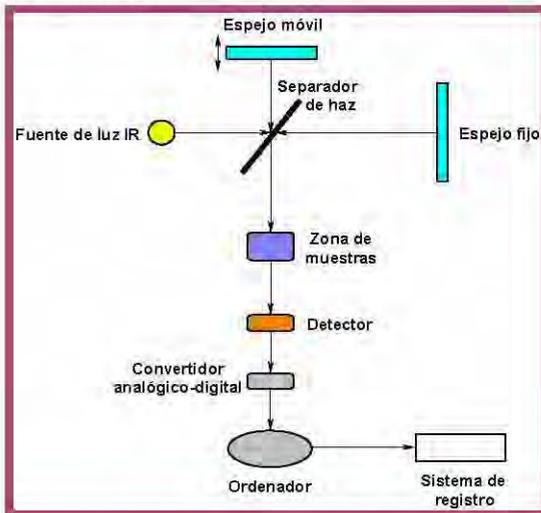


Fig. II.3. Esquema descriptivo de los componentes principales del FTIR.

Los equipos FTIR utilizan un dispositivo óptico llamado interferómetro, el cual produce una única señal, que tienen todas las frecuencias codificadas en él. La señal se puede medir con gran rapidez, por lo general en el orden de un segundo o menos, por lo tanto el tiempo por muestra, se reduce a una cuestión de pocos segundos, en lugar de varios minutos. Los interferómetros emplean un divisor de rayos (*beamsplitter* en inglés), el cual es un instrumento óptico que divide un rayo de luz en dos: un haz se refleja en un espejo plano fijo, y el otro un espejo plano con la capacidad de moverse unos pocos milímetros de distancia del *beamsplitter*.

Los dos haces se reflejan en sus respectivos espejos y se recombinan cuando se reflejan de vuelta con el *beamsplitter*. (Fig. II.3). Debido a que la vía que un rayo recorre es a una longitud fija y el otro está constantemente cambiante, y el espejo se mueve, el signo que existe en el interferómetro es el resultado de estos dos rayos, en los que interfieren uno con otro, generando lo que se conoce como interferograma.

El interferograma tiene la propiedad única, que cada punto de los datos que constituye la señal tiene información sobre todas las frecuencias infrarrojas, que proviene de la fuente. Esto permite medir todas las frecuencias al mismo tiempo, obteniendo como resultado, mediciones más rápidas con el interferómetro.

Debido a que se requiere un espectro de frecuencias, para poder hacer una identificación, la señal del interferograma no puede ser interpretada directamente. Se necesita de un medio para descifrar cada frecuencia. Lo que se logra a través de una técnica matemática llamada Transformación de Fourier, la cual es realizada por el ordenador del equipo, donde se digitaliza la señal, dando como resultado el espectro de bandas.

OBJETIVOS

En este capítulo se planteó como objetivo desarrollar técnicas útiles en la industria de extracción y caracterización química del carragenano en muestras de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá. Si bien es cierto, como vemos, la bibliografía presenta una variedad de técnicas de análisis estructurales de ficocoloides, en nuestro trabajo utilizamos la técnica del FTIR, por la facilidad de acceso, manejo de muestras e interpretación de los datos. Por todo lo expuesto, los objetivos de este trabajo son:

1. Desarrollar un método de extracción adecuado, que nos permita controlar la calidad de carragenano en los cultivos de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá.
2. Utilizar la técnica del FTIR como un método fácil y rápido para la valorización cualitativa del carragenano de los cultivos de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá.

MATERIAL Y MÉTODOS



CAPÍTULO II



CLAUDIA MASSIEL PÉREZ GONZÁLEZ

Material Vegetal

Se tomaron 12 muestras de algas secas y frescas al azar de la especie cultivada en las granjas de Cativá, Bahía de Las Minas, (09°23'22.05"N 79°52'11.83"O) Provincia de Colón, República de Panamá. Las muestras de algas secas fueron obtenidas según el procedimiento de secado *in situ* llevado a cabo en los secadores artesanales, expuestos o semiexpuestos al sol, según describió Batista (2009). Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente en lugar fresco y seco.

A las muestras frescas se les retiró el exceso de agua y fueron empaquetadas entre láminas de papel filtro, y almacenadas a -20 °C, hasta su utilización. Ambos tipos de muestras fueron transportadas al laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal Marina del Departamento de Biología de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria para su estudio.

Extracción y cuantificación del carragenano

Para valorar la calidad del carragenano de los cultivos de Panamá, inicialmente se procedió a su extracción comparando distintos métodos de extracción del carragenano. Estos se encuentran referenciados en la bibliografía y corresponden a

Fostier et al. (1992), Ohno et al. (1996), Freile-Peigrín et al. (2006).

Todos los métodos se adaptaron a nuestras condiciones y materiales del laboratorio, manteniendo en común etapas básicas referentes a la extracción en solución, la precipitación (con compuestos orgánicos), filtrado con filtros de papel Watman y lavado del producto (con etanol), como se detalla en la tabla II.2. Las singularidades hacen referencia al volumen de extracción, características químicas del medio y el tipo de sal.

Tabla II.2. Detalles de los métodos de extracción de carragenano, adaptados, en nuestro laboratorio, para la especie estudiada con indicación del método originario de extracción de carragenano según los diferentes métodos.

Método de Extracción	Vol (mL)	Sol. Extracción	pH	T °C	Tiempo de exposición (h)	Precipitación	Lavados
Fostier et al. 1992 (natural)	30	-	-	70-80	4	2-Propanol	Etanol 95%
Fostier et al. 1992 (alcalino)	30	NaOH 0.8 %	-	70-80	4	2-Propanol	Etanol 95%
Ohno et al. 1996 (alcalino)	20	KOH 6%	-	70-80	1	Acetona 15%	Etanol 95%
Ohno et al. 1996 (ácido)	20	H ₂ SO ₄	3	70-80	1	Acetona 80%	Etanol 95%
Freile-Pelegrin et al. 2006	50	KOH 1%	8.0	85	3	CTAB 2%	1. Etanol 95% + Acetato de sodio 2. Etanol 95%
Combinado de Fostier & Freile-Pelegrin	30	NaOH 0.8 %	-	70-80	4	CTAB 2%	Etanol 95%

A continuación, se describe en detalle cada método adaptado .

Método de Fostier et al. (1992) (alcalino y natural)

El método de Fostier se adaptó para una extracción en medio acuoso y otra en medio alcalino. Para la extracción acuosa se obtuvo una pasta, resultante del calentamiento a 70-80 °C durante 4 horas, de una mezcla de 0.5 g de alga seca en 30 mL de agua Millie Q. A continuación, se agregó un volumen de 75 mL de 2-propanol (Sigma Co.) para precipitar y luego se filtró con papel filtro, se lavó con etanol al 95%, y se dejó secar a 60°C durante 16 h. En el método Fostier modificado alcalino el procedimiento es el mismo con la excepción que la pasta resultante se obtuvo en presencia de NaOH (0.2 N). Fig. II.4 (2 y 3).

Método de Ohno et al. (1996) (alcalino y ácido)

El método de Ohno modificado se realizó con una extracción alcalina y otra ácida. La extracción alcalina consistió en la maceración de 0,5 g de alga seca en 20 mL de una solución de KOH (6%, w/v) durante 3 horas. A continuación se calentó a 70-80 °C, durante 1 h. La precipitación tuvo lugar con la adición de acetona (80%, v/v) en una ratio de 3 mL acetona: 20 mL solución de KOH. La mezcla resultante se filtró, se lavó

varias veces con etanol (95%, v/v) y se dejó secar en el horno a 60°C.

La extracción ácida consistió en una digestión en 20 mL de H₂SO₄ (5%, v/v), pH 3, de 0.5 g de alga seca a 30 °C durante 3 horas. A continuación se dejó a 70-80°C durante una hora y se precipitó con 3 mL de acetona al 80% (3 veces). Se lavó varias veces con etanol (95%, v/v), y se secó en el horno a 60 °C. Fig. II.4 (4 y 5).

Método de Freile-Peegrín et al. (2006) (modificado).

El método de Freile-Peegrín se basó en la digestión de 0.5 g de alga en 50 mL de KOH 1% (p/v), pH 8.0, durante 12 h. A continuación se calentó a 85 °C durante 3 h y se precipitó con 25 mL de una solución de 2%, (w/v) CTAB (Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide) preparada en una solución de acetona: agua Milli-Q (1:9). El pellet fue separado con filtros Whatman y la pasta o mezcla (*slurry*) obtenido se lavó tres veces con etanol (95% v/v) saturado en acetato de sodio (Sigma Co). Fig. II.4 (1).

Método combinado de Fostier & Freile-Peegrín.

Finalmente, se chequeó un método combinado entre las extracciones modificadas alcalina de Fostier et al. 1992 y de

Freile-Pelegrín et al. 2006. Así, se pesaron 0.5 g de alga y se incubaron en 30 mL de una solución 0.2 N NaOH durante 4 horas y entre 70-80°C. A continuación, se precipitó con 15 mL de CTAB (2% w/v) en una solución acetona: agua Milli-Q (1:9), se filtró y se lavó con etanol (95%, v/v) saturado en acetato de sodio (Sigma), y finalmente con etanol al 95%. Fig. II.4 (6).



Fig.II.4. Proceso de extracción de carragenano y las diferentes texturas presentadas por cada método de extracción. 1) Freile-Pelegrín et al. (2006), 2) Fostier et al. (1992) natural, y 3) Fostier et al. (1992) alcalino, 4) Ohno et al. (1996) ácido, 5)

Ohno et al. (1996) alcalino, 6) Combinado de Fostier & Freile-Peigrín.

Valoración cualitativa del carragenano

Para la valoración cualitativa del carragenano mediante la técnica del FTIR, se tomaron 4 mg de carragenano de cada una de las muestras obtenidas, con los diferentes métodos de extracción descritos arriba, y kappa-carragenano grado comercial (Sigma Commercial Grade, Type 1). Cada muestra se mezcló independientemente con 10 mg de bromuro de potasio (Sigma). La pasta resultante se prensó a 3 Ton cm^{-2} , formándose pastillas con dichos compuestos.

Los espectros, de cada una de las muestras, se obtuvieron en un espectrómetro FTIR modelo RS/1 (UNICAM), que medía a intervalos de 2000 a 400 cm^{-1} , una resolución de 2 cm^{-1} y espejos giratorios hacia adelante y hacia atrás a una velocidad de 10 y 6.2 kHz respectivamente (Fig. II.5).

Las bandas de los espectros obtenidos fueron comparadas con aquellas características de los ficocoloides, según una revisión bibliográfica previa, considerando las mismas condiciones experimentales de nuestro análisis y que se muestran en la tabla II.3.



Fig. II.5. Proceso de elaboración de las pastillas con Bromuro de Potasio. A) Mortero con la muestra y 4 mg aprox. de Bromuro de potasio. B) Pastilla obtenida de la prensa hidráulica. C) Espectrofotómetro FTIR modelo RS/1 (UNICAM). D) Prensa hidráulica Perkin Elmer.

Tabla II.3. Bandas (cm^{-1}) y sus correspondientes grupos funcionales dependiendo de los diferentes tipos de carragenano, obtenidas mediante la técnica del FTIR.

Bandas	Grupo funcional	Tipo de Carragenano	Referencia
1240-1250 cm^{-1}	Polisacáridos ester sulfatados	κ , ι (+), λ (++)	Dawes 1977; Chopin et al. 1990; Chiovitti et al. 1997
930 cm^{-1}	3,6 anhidrogalactosa	κ , ι	Dawes 1977; Chopin et al. 1990; Chiovitti et al. 1997; Pereira et al. 2003
905 cm^{-1}	(meseta) 1,4-ligado Anhidro-D-galactosa-2-sulfato	3,6 ι	Chopin et al. 1990; 1999.
867 cm^{-1}	(meseta) grupo sulfato en el carbono 6 de galactosa.	λ	Chopin et al. 1999; Freile-Pelegri et al. 2006.
845 cm^{-1}	D-galactosa-4-sulfato (Mix kappa e iota)	κ, ι	Chopin et al. 1990; Pereira et al. 2003; Freile-Pelegri et al. 2006.
825-830 cm^{-1}	Galactosa-2-sulfato	λ	Fostier et al. 1992, Chopin et al. 1999; Pereira et al. 2003.
815-820 cm^{-1}	Galactosa-6-sulfato	λ	Fostier et al. 1992; Chopin et al. 1999.
805 cm^{-1}	3,6-anhydro-D-galactosa-2-sulfato	ι	Dawes 1977; Chopin et al. 1990; Chiovitti et al. 1997; Pereira et al. 2003; Freile-Pelegri et al. 2006.

RESULTADOS



CAPÍTULO II



CLAUDIA MASSIEL PÉREZ GONZÁLEZ

Extracción y cuantificación del carragenano.

El carragenano presentó un aspecto fibroso y su textura varió según el método utilizado. En la tabla II.4 se reflejan los métodos empleados por la extracción de carragenano y la producción de ficocoloide en unidades de g de carragenano g^{-1} peso seco del alga.

Se obtubieron porcentajes altos entre 58 y 68 %, asumiendo 1 g era el equivalente a 100%, para los métodos de Fostier et al. (1992) (alcalino y ácido) y Freile-Pelegrín et al. (2006). Los métodos restantes de Ohno et al. (1996) (alcalino y ácido) y Combinado de Fostier & Freile-Pelegrín no presentaron fibras de carragenano.

Tabla II.4. Productividad de carragenano obtenida en los diferentes métodos de extracción probados (los datos son la media \pm SE, n=6; n.d. no se obtuvo fibras de carragenano); ns, diferencias no significativas fueron observadas en comparaciones múltiples, p=0.05).

Método	Productividad (g carragena g ⁻¹ p.s. alga)
Fostier et al. (1992) (alcalino)	0.613 \pm 0.11 ^{ns}
Fostier et al. (1992) (natural)	0.570 \pm 0.11 ^{ns}
Ohno et al. (1996) (alcalino)	n.d.
Ohno et al. (1996) (ácido)	n.d.
Freile-Peigrín et al. (2006)	0.689 \pm 0.09 ^{ns}
Combinado de Fostier & Freile-Peigrín	n.d.

Valoración cualitativa de carragenano

En la figura II.6 se representan las bandas generadas por el FTIR para los distintos carragenanos obtenidos mediante los diferentes protocolos de extracción. El kappa carragenano comercial de Sigma Co. se caracteriza por la presencia de bandas correspondientes a ésteres sulfatados a 1162-1240 cm⁻¹, enlaces C-O en ésteres sulfatados a 1130 cm⁻¹, galactosa a 970 cm⁻¹, 3,6 anhidrogalactosa a 930 cm⁻¹, β -D-galactosa no

sulfatada a 890 cm^{-1} , a 740 cm^{-1} enlaces C-S/C-O-C y C-O-SO₄.

La comparación de los espectros entre kappa-carragenano (comercial) con cada uno de los carragenanos problemas (Tabla II.5) permite deducir que el carragenano obtenido mediante los procedimientos descritos por Fostier et al. (1992) alcalino, carece de las bandas 1240-1162, 1130, 970, 890, 740, 705 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales de ésteres sulfatados, galactosa, y β -D anhidrogalactosa no sulfatada respectivamente, presentando solo las bandas de 3,6 anhidrogalactosa (930 cm^{-1}) y 4 galactosa sulfatada (845 cm^{-1}) al igual que el método Fostier et al. (1992) natural. La diferencia es que este último método sí presenta ésteres sulfatados ($1240\text{-}1162\text{ cm}^{-1}$).

Los métodos de Ohno et al. (1996), tanto el alcalino como el ácido, no presentaron las bandas características de la kappa-carragenano comercial; el método de Freile-Peigrín et al. (2006) presenta todas las bandas al igual que el método combinado de Fostier & Freile-Peigrín solo que este último además presenta zonas de ruido relacionadas posiblemente con la presencia de contaminantes.

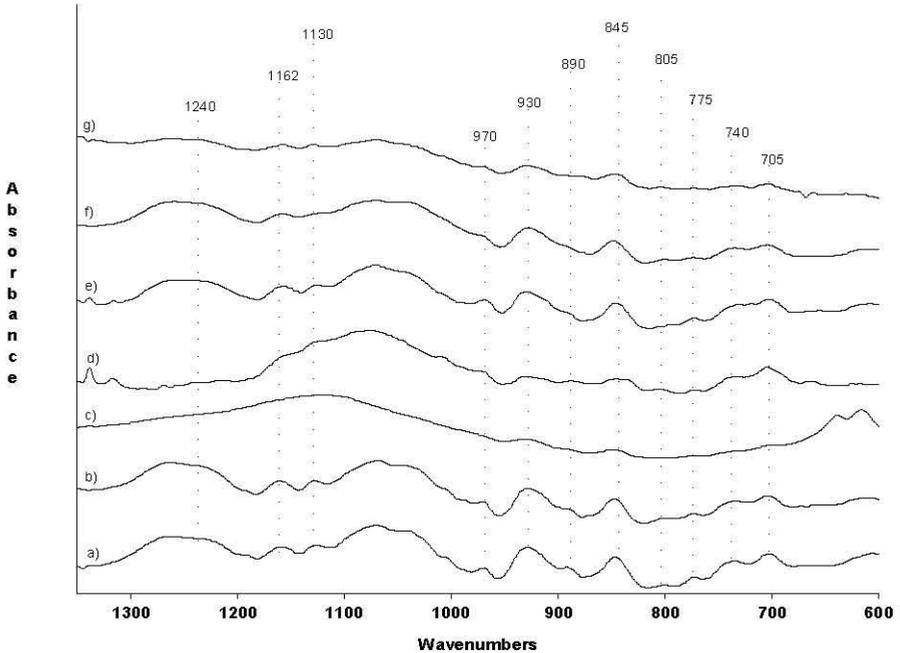


Fig. II.6. Espectro de bandas generadas por el FTIR entre los 600-1300 cm⁻¹ de las muestras de carragenano extraído de los cultivos de *Kappaphycus alvarezii* mediante los diferentes métodos: a) Kappa-carragenano comercial, b) Freile-Pelegrín et al. (2006) (modificado), c) Ohno et al. (1996) extracción ácida (modificado), d) Ohno et al. (1996) extracción alcalina (modificado), e) método combinado de Fostier & Freile-Pelegrín, f) Fostier et al. (1992) extracción natural, g) Fostier et al. (1992) extracción alcalina.

Tabla II.5. Bandas características del carragenano comercial y aquellas generadas por los diferentes métodos de extracción.

Bandas (cm ⁻¹)	Grupos Funcionales	Procedencias de muestras						
		Carragena- no Comercial	Fostier et al. 1992 (natural)	Fostier et al. 1992 (alcalino)	Ohno et al. 1996 (alcalino)	Ohno et al. 1996 (ácido)	Freile- Pelegrin et al. 2006	Combinado de Fostier & Freile- Pelegrin
1240- 1162	Esteres sulfatados	✓	✓				✓	✓
1130	Enlace C-O en ester sulfatado	✓					✓	✓
970	Galactosa	✓					✓	✓
930	3,6 anhydrogalactosa	✓	✓	✓			✓	✓
890	B-D-galactosa (no sulfatada)	✓					✓	
845	Galactosa 4 sulfatada	✓	✓	✓			✓	✓
740	C-S/C-O-C	✓					✓	
705	C-O-SO ₄	✓			✓		✓	✓

DISCUSIÓN



CAPÍTULO II



CLAUDIA MASSIEL PÉREZ GONZÁLEZ

Factores que influyen en la productividad y calidad de los ficoloides

Desde que se iniciaron los cultivos de *Kappaphycus alvarezii* en Panamá, en el año 2000, se han llevado a cabo estudios a cerca de la productividad a nivel de cultivo a lo largo de todo el año (Batista 2009). En este trabajo se demostró que el cultivo mantiene una productividad estable a nivel de biomasa, es decir, no viéndose influenciada por las condiciones ambientales a lo largo del año.

Sin embargo, es sabido que los carragenanos y los ficocoloides en general, se ven afectados por diferentes factores, como la fuente del alga, las condiciones ambientales, y el método de extracción (Arvizu-Higuera et al. 2008; Hayashi et al. 2007b; Santos 1980); los cuales a continuación detallamos, y que son importantísimos a la hora de comercializar esta materia prima.

El primero de ellos, es la fuente del alga, es decir, hay diferentes especies de algas que producen el mismo tipo de carragenano pero de diferente calidad. Por ejemplo *Eucheuma uncinatum* y *Eucheuma espinosum* producen iota carragenano, pero los monosacáridos como β -D-galactosa-4-sulfato varían entre 45 y 50 % respectivamente, es decir, difieren en cuanto a las proporciones de dicho monosacárido, además de que *E.*

uncinatum presenta dos monosacáridos más (4-β-D-galactosa-6-sulfato y 2,6 disulfato) que *E. espinosum*. Esta diferencia hace que bajo un tratamiento alcalino, *E. uncinatum* incrementa el iota carragenano ideal hasta un 90% (Santos 1989).

Otras especies producen un tipo de carragenano diferente según su ciclo reproductivo. Especies como *Gigartina* y *Chondrus crispus* producen lambda carragenano en su fase esporofítica, mientras que, en su fase gametofítica produce un tipo de carragenano híbrido de kappa e iota, conocido como "kappa-2", el cual consiste en una mezcla de cadenas de polisacáridos que contienen unidades de kappa e iota en una misma proporción que el carragenano puro (van de Velde 2008, Campo et al. 2009). En esta línea, las muestras gametofíticas de *K. alvarezii* de Brasil, presentaron mayores valores de peso molecular, viscosidad y dureza de gel, que las muestras con ciclo reproductivo desconocido o sin definir (Hayashi et al. 2007b).

Otro de los factores importantes que influyen en la productividad y la calidad de los ficocoloides es la edad del tejido. El estudio realizado por Mendoza y colaboradores (2006) en las especies *Kappaphycus striatum* cultivadas en Filipinas, demostraron diferencias en cuanto a calidad y productividad del carragenano extraído, en tejidos nuevos (zona apical) y viejos (zona basal), donde encontraron una

mayor productividad o contenido de carragenano en los tejidos viejos (talo basal). Mientras que la calidad de la dureza del gel y las propiedades cohesivas de los geles de carragenano decrecen en los tejidos nuevos a medida que van madurando, se mantienen las características flexibles del gel. En este sentido, estudio realizado por Hayashi et al. (2007b), en *Kappaphycus alvarezii*, encontraron que los tejidos viejos podrían producir más carragenano, lo que los hace más elásticos, lo cual los podría preservar de posibles rompimientos del tallo como consecuencia del incremento de la biomasa.

Respecto a las condiciones ambientales, nuestros resultados de productividad de carragenano están en concordancia con aquellos valores reportados en *K. alvarezii*, realizados bajo diferentes condiciones ambientales. Por ejemplo, Rui y colaboradores (1990) compararon la productividad de carragenano en *K. alvarezii*, en cultivo a mar abierto y cultivo en tanques, obteniendo un 57% en sistemas abiertos y un 53 % en tanques. Estos valores se presentan dentro de los valores aceptables de productividad de carragenano, y en concordancia con nuestros valores obtenidos entre 57 y 68% en mar abierto.

Por su parte, Hayashi y sus colaboradores (2007b), en su estudio realizado en cultivos de *K. alvarezii* de Brasil,

determinaron la productividad de carragenano, presentaba diferencias según los número de días de cultivo, siendo mayor del 30 % a los 28 días y a los 59 días presentaba un porcentaje de aproximadamente del 25%. En nuestro caso, no se compararon muestras a lo largo del periodo de cultivo, las muestras fueron tomadas al final de la cosecha, con un periodo de cultivo de 60 días.

Algunos autores reportan también el efecto de la profundidad, para el establecimiento del cultivo del alga, en la productividad de carragenano en los cultivos. El estudio realizado por Hurtado-Ponce 1995, en tres morfotipos de *K. alvarezii* (pardo, verde y rojo) de Filipinas, a profundidades de 50 y 100 cm, recogió productividades mayores en el morfotipo rojo (10.8-11.6 %) en ambas profundidades, seguido por el morfotipo pardo (8.5-7.5 %) y verde (4.7-4.8 %) respectivamente. Hurtado y colaboradores (2008) estudiaron también la relación de la profundidad (50, 100, 150, 200 cm), con los días de cultivo (30, 45, 60) y con la productividad de carragenano, encontrando la mayor productividad de carragenano (34.8 %) a 100 cm de profundidad, a los 60 días de cultivo.

Es importante mencionar que los valores de productividad de carragenano, de *K. alvarezii* de Filipinas reportados por Hurtado-Ponce (1995) , son relativamente bajos

en comparación con los resultados obtenidos por el mismo autor, en la especie *Kappaphycus striatum*.

Sin embargo Hayashi y sus colaboradores (2007b) determinaron que la profundidad y la densidad de plantas (número de semillas por m²) no influyeron en la productividad y calidad del carragenano en la especie *K. alvarezii* de Brasil. En los sitios de cultivo de *K. alvarezii* establecidos en Panamá, la profundidad aproximada es de 30 cm, en la cual se obtiene una alta tasa de crecimiento diario.

La bibliografía también reporta el efecto estacional en la productividad de carragenano. El estudio realizado por Maixin y colaboradores (1988) recogió efectos estacionales en la productividad de carragenano, siendo mayor en la estación de invierno (69.2 %) que en verano (57.1 %) en la especie *Eucheuma gelatinae*, hoy en día conocida como *Bethaphycus gelatinum*.

En otro estudio similar, Hayashi y colaboradores (2007a) determinaron la productividad de carragenano en tres morfotipos de *K. alvarezii*, (verde, pardo y rojo) en la cual el morfotipo pardo presentó valores significativamente bajos en febrero y mayo, y valores significativamente altos, en diciembre. También el reciente trabajo realizado por Hillou et al. (2012), en la especie *Mastocarpus stellatus* de Portugal, reveló una significativa variación estacional encontrando la menor

productividad de carragenano en el mes de mayo, relacionado con el periodo de rápido crecimiento, y concluyeron que el mejor mes para cosechar las algas es el mes de agosto, porque presentaba las mejores propiedades gelificantes y de alta productividad.

Siguiendo con el factor morfotipo, otros autores como Wakibia et al. (2006) estudiaron dos morfotipos de *K. alvarezii* (verde y pardo) de Kenia, encontrando una mayor productividad en el morfotipo verde (59.1% peso seco) que en el pardo (56.5% peso seco), y también reportaron variaciones de productividad de carragenano según los meses cultivados, siendo los mas altos en el mes de septiembre (59.3 %) mientras que los valores mínimos se reportaron en el mes de octubre (55.5 %) y abril (55.1%).

Los estudios, realizados por Muñoz y colaboradores (2004) en los tres morfotipos de *K. alvarezii* en la Península de Yucatán México, mostraron porcentajes de carragenano más altos en el morfotipo verde, que en rojo y pardo, sin embargo esta diferencia no era significativa. En este sentido, los estudios realizados en la especie *Eucheuma isiforme*, Freile-Pelegrín et al. (2006) obtuvieron también cambios mensuales significativos, con modificaciones evidentes tanto en el peso seco y en la productividad de carragenano. Los bajos valores se presentaron a finales de la estación fría y principios de la

seca, mientras que, los valores altos lo fueron a finales de la extensión lluviosa y principios de la fría. El porcentaje de carragenano extraído fue entre 33.2-45.5 %, y una productividad media anual de 38.9% para esta especie, donde se demostró que la productividad del carragenano presentó una correlación positiva con el contenido de nutrientes y una relación inversa con la luz incidente.

En nuestro caso, las muestras fueron recolectadas sin tomar en cuenta el factor estacional, debido a la dificultad de acceso al muestreo de los cultivos y las dificultades del envío (más de 9 000 km de distancia) hasta el laboratorio de trabajo. Se entiende, no obstante, que nuestros valores de carragenano son estables a lo largo de todo el año.

Otro de los factores que afecta la productividad del carragenano, según el estudio de Wakibia y colaboradores (2006), son las características de los sitios de cultivo. Estos autores estudiaron tres sitios de cultivo diferentes, pero donde se detalló una mayor productividad de carragenano, se caracterizaba por tener mayor movimiento de agua que los otros sitios.

Wakibia y sus colaboradores (2006), asumen que esto se debe posiblemente a dos factores: i) debido al mayor movimiento de agua que presenta este sitio, como se ha mencionado; el alga se adaptó a las fuertes condiciones ambientales a través de la síntesis adicional de polisacáridos

estructurales de la pared celular, los cuales proveen a las algas de un soporte estructural más flexible en respuesta a las corrientes de agua y acción de las olas y, ii) además esta condición les provee un mayor flujo de carbono y nitrógeno, suficientes para mantener esas altas tasas de crecimiento relativo y alta productividad de carragenano.

El estudio realizado por Rui y colaboradores (1990), en cultivos experimentales de *K. alvarezii* en China, en el cual estudiaron el efecto de la fertilización con nitrógeno de los cultivos, indicaron que concentraciones de 5-25mM son necesarias para obtener tanto una buena tasa de crecimiento, y contenido de carragenano.

Autores como Muñoz y colaboradores (2004) concluyen que el crecimiento del alga está regulado por una compleja interacción entre factores como la irradiación, temperatura, nutrientes y corrientes; algunos de estos factores pueden interactuar, regulando el crecimiento de estas especies, de manera que una disminución importante de un factor, por ejemplo lo nutrientes, podría ser compensado por otro factor, por ejemplo, la corriente. Esta compleja interacción afecta el crecimiento del alga y por ende, la productividad de carragenano.

En definitiva, el conocimiento de las diferentes condiciones ambientales del cultivo, patrones de crecimiento estacionales y su relación con la productividad de carragenano,

son una herramienta útil para la planificación de un ciclo productivo, más eficaz y rentable.

Una vez mencionados las condiciones naturales y ambientales, que pueden afectar la productividad de carragenano, otro de los factores importantes, una vez cosechada la biomasa, es cómo esa biomasa se procesa para obtener la materia prima. Un buen tratamiento de secado post cosecha es un factor importante para la productividad y calidad del carragenano.

De los métodos de secado de las algas, los más comunes son: i) secados al sol, con y sin la eliminación de epífitos y de sales, (Montolalu et al. 2008), ii) secados en horno (Hilliou et al. 2006; Aguilan et al. 2003; Fostier et al. 1992, Freile-Pelegín et al. 2006, Cheney et al. 1987, Prasad et al. 2003, Pereira et al. 2003) y iii) mediante liofilización (Fournet et al. 1999).

En muchos lugares, las algas son secadas al sol durante 2 ó 3 días hasta que tenga un porcentaje de humedad de 35%. Si el porcentaje de humedad supera el 40 % del peso, las algas pueden descomponerse durante el almacenamiento o el transporte (McHugh 2003). En este sentido, el estudio realizado por Batista (2009), en los sistemas de secado para las algas de

Panamá, determinó unos porcentajes de entre el 10 y 15 %, lo que afecta a la calidad final del producto y debe ser mejorado con la optimización de los sistemas de secado .

No obstante, el secado podrá imprimir otras características a la materia prima que podrán ser útiles para su explotación. Por ejemplo, Santos (1980), en sus estudios extrayendo carragenano de *Euclima uncinatum*, obtuvo geles con una alta viscosidad, mientras que, el carragenano, extraído del material secado al horno, presentó mayor dureza del gel.

Como hemos mencionado antes, nuestros porcentajes de productividad de carragenano están entre los valores previamente documentados para especies similares. Sin embargo, desde el punto de vista comercial la extracción del carragenano no debe ser agresiva, y así evitar la fragmentación, alteración de la molécula, o pérdida de grupos funcionales característicos, al tiempo, que nos permita mantener una buena productividad la materia prima a exportar. En este sentido, y como hemos detallado, la bibliografía consultada revela que la calidad del carragenano es dependiente no solo de la naturaleza del alga, de las condiciones ambientales, o del tratamiento de secado, sino también, del efecto de los métodos de extracción empleados.

Los parámetros como el pH, la temperatura y el tipo de sal utilizada pueden tener un impacto dramático en la propiedades químicas de los biopolímeros y en sus correspondientes propiedades del gel (Hilliou et al. 2006).

El pH es uno de estos parámetros que influyen en la calidad y productividad del carragenano. Santos (1980) realizó unos de los primeros estudios donde se planteaba la importancia de mantener un pH entre 8 y 9 para mantener la estabilidad de la molécula de carragenano, es decir, que a esos pH, la molécula aún conservaba todas sus propiedades. Sin embargo, en la bibliografía, incluso reciente, encontramos autores que no toman en cuenta este parámetro, no detallando en su método el pH utilizado. Como por ejemplo el estudio realizado en *Agardiella subulata* por Cheney y colaboradores 1987, obteniendo porcentajes de carragenano de un 28.6 %.

En esta línea, Prasad y colaboradores (2003), realizaron estudios en el alga roja *Meristotheca procumbens*, obteniendo un 31 % de porcentaje de carragenano. Estos valores son bajos en comparación a los obtenidos en nuestro trabajo (57-68%) con los métodos de Fostier et al. (2002) (natural y alcalino) y Freile-Pelegrín et al. (2006), posiblemente debido al efecto del pH. De los métodos utilizados en nuestro estudio, el método de Ohno et al. (1996) (ácido y alcalino), Fostier et al.

(1992) y Combinado de Fostier & Freile-Peagrín, no se tomaba en cuenta el factor pH.

En este sentido, entendemos que la escasa o nula presencia de carragenano, en nuestras muestras, atendiendo a los métodos de Ohno et al. (1996) (ácido y alcalino) y Combinado de Fostier & Freile-Peagrín se debe posiblemente a este factor. En el caso del método de Fostier et al. (1992), que a pesar de que no se toma en cuenta el factor pH, se obtuvo porcentajes de carragenano de 57 (natural) y 61 (alcalino), sin embargo, en los análisis de la técnica del FTIR, vemos que ha perdido los grupos funcionales característicos de este ficocoloide, punto que discutiremos más adelante.

Sin embargo, nuestros resultados tampoco coinciden con los reportados por Ohno et al. (1996) en *K. alvarezii* de Vietnam, donde obtuvo valores de 42.9-51.9 % (peso seco), aunque estos autores no especifican las productividades obtenidas por tratamiento (ácido y alcalino). Esta no coincidencia posiblemente puede ser debido a diferentes causas, entre ellas las que ya hemos mencionado antes, la naturaleza del alga, o las condiciones ambientales.

Respecto al tipo de alga, nuestros estudios han determinado que efectivamente de las muchas menciones realizadas a los cultivos de Panamá (Eucheuma,

Kappaphycus), la especie cultivada es *Kappaphycus alvarezii*, según los datos moleculares que se muestran en este trabajo; pero no así existe la misma certeza para la especie procedente de Vietnam. En relación a las condiciones ambientales, sí que son diferentes y en estas circunstancias de desarrollo pueden hacerlas resistentes o no, afectando a la síntesis de esta materia prima de manera diferente. Ineludiblemente este hecho afectaría al resultado final dependiendo del tipo de tratamiento, o grado de pH.

Otro dato importante a destacar y que apoyaría esta discusión es que estos autores (Ohno et al. 1996) no corroboraron la presencia de los grupos funcionales característicos del carragenano, por lo que queda por comprobar si esa alta productividad también presentaba una alta calidad, información que en nuestro estudio sí fue corroborada.

En esta línea de argumentación y teniendo en cuenta que este parámetro químico (pH) determina la acidez o la alcalinidad de una solución, la presencia de sales, y la temperatura, en el proceso de extracción, también afectaría al pH de trabajo. En su trabajo Fostier y colaboradores (1992), tampoco describen a qué pH extrajeron carragenano en las especies *Anatheca montagnei* y *Meristotheca senegalensis*, utilizando dos métodos al que llamaban natural, refiriéndose a

carragenano semirefinado, y el alcalino con NaOH, y del que obtuvieron resultados de 24-36 % y 19-30 % respectivamente y caracterizaron al carragenano mediante espectros IR (más adelante discutiremos la importancia de esta técnica).

Nuestros valores obtenidos fueron superiores al de esas especies (>20 %), por lo que, si no consideramos a la especie o el pH, los resultados se pueden explicar por otros factores que pueden influir como los mencionados del tipo de sal, y de la temperatura, los cuales pueden intensificar o atenuar el efecto pH.

Siguiendo con los autores de la bibliografía, se han reportado extracciones a pH entre 6 y 7. Por ejemplo, Murano y colaboradores (1997), en su estudio con las especies *Solieria filiformis* y *Agardhiella subulata*, a temperaturas altas y bajas, obtuvieron valores de 78% en *S. filiformis* a 25 °C y en *A. subulata* un 60% a 85°C, reportando porcentajes similares y superiores a nuestros valores, y corroborando sus resultados con el análisis de FTIR como nuestro caso.

Siguiendo con el análisis de la importancia del pH, muchos son los autores que toman en cuenta este parámetro. En este sentido, Dawes (1977), en su estudio en especies *Eucheuma isiforme*, *E. gelidium* y *E. nudum*, de Florida, y haciendo las extracciones a un pH entre 8-8.5, obtuvo porcentajes de carragenano de 47-80% en todas las especies

estudiadas, y cuya variación está relacionada con la estacionalidad. Los porcentajes menores (47%) ocurrieron en otoño y los mayores en primavera (80%).

Atendiendo a los protocolos de extracciones, Hoffmann et al. (1995) realizaron extracciones a pH 8-9 y a una temperatura de 95°C, y se aseguraron que estas condiciones no afectaran las propiedades químicas del carragenano a través de la técnica de resonancia magnética nuclear del carbono (C-NMR).

Siguiendo en esta línea, Hillou y sus colaboradores (2006), hicieron extracciones de carragenano en *Mastocarpus stellatus* procedente de las costas del norte de Portugal, a diferentes pH de 7-9, bajo diferentes temperaturas de 95-110 °C, obteniendo la mayor productividad (38%) a 95°C y pH 9. Este trabajo, al igual que el de Hoffmann y colaboradores (1995), exponen la importancia tanto del pH y la temperatura, en la propiedades químicas del carragenano.

En nuestras muestras, las extracciones fueron realizadas a temperaturas entre 70-85 °C, las cuales son temperaturas aceptadas en la bibliografía para la extracción. Sin embargo, el pH es uno de los factores que sí variaba en nuestros métodos oscilando entre pH 3 y pH 10 y presentaba en estos extremos, problemas relacionados con al obtención de la materia prima en cuestión.

El tiempo de extracción es otro de los factores que puede afectar al método. Los estudios realizados por Arvizu-Higuera y colaboradores 2008, basados en extracciones de agar en *Gracilaria vermiculophylla*, proponen que los tratamientos alcalinos en tiempos cortos (0.5 h) mejoran significativamente la dureza del gel, incrementándolo hasta 14 veces más que la extracción semi-refinada. Los trabajos realizados por Freile-Pelegrín y colaboradores (2006), extrayendo carragenano en *Eucheuma isiforme*, reportaron que la duración extensa de los tratamientos, afectaban de manera importante al contenido de sulfato y al contenido de 3,6 anhidro galactosa extraído, y consecuentemente afectan la calidad del carragenano.

Por otro lado, los estudios realizados por Montolalu y sus colaboradores (2008) en la especie *K. alvarezii*, en donde identificaron que tanto la temperatura como el tiempo de exposición, mostraron la influencia de las propiedades del gel, tanto en su peso molecular como en la productividad de carragenano, y reportaron las mejores condiciones bajo extracciones de 5 horas con una temperatura de 50 o 70 °C.

Sin embargo, el trabajo realizado por Webber y colaboradores (2012), en *K. alvarezii*, indicó que el tiempo de extracción no afecta ni la productividad ni la viscosidad del carragenano, considerando a la temperatura el parámetro más

importante e influyente en las propiedades del carragenano extraído.

Siguiendo con el conjunto de factores químicos, se ha estudiado también los resultados de las extracciones en medio alcalinos o ácidos con pH fijo. De manera general, los tratamientos alcalinos son usados en la industria para incrementar las propiedades gelificantes del carragenano crudo, que puede ser llevado a cabo bajo condiciones experimentales menos agresivas, dando productos con alta dureza de gel y evitando degradación (Ciancia et al. 1993).

El tratamiento alcalino básicamente transforma los precursores biológicos μ (μ -) y ν (ν -) carragenano en los carragenanos comerciales kappa e iota carragenano (Campo et al. 2009). Este tratamiento remueve los grupos primarios 6-sulfato en los carragenanos μ , ν , y lambda, formando 3,6 anhidrogalactosa (3,6 AG), lo que da lugar a kappa e iota carragenano e incrementa la dureza del gel. Sin embargo, el lambda carragenano no forma geles, por la falta en su estructura de las unidades de β -D-galactosa-4-sulfato (Santos 1980; Lahaye 2001).

Algunos autores consideran que el tratamiento alcalino presenta desventajas, debido a que disminuye la productividad del polisacárido (Arvizu-Higuera et al. 2008; Villanueva et al. 2009 y referencias contenidas), además de generar efluentes,

los cuales pueden presentar efectos destructivos en el medio ambiente, cuando son descartados sin tratamiento (Freile-Peigrín et al. 2002). Para evitar este problema se ha propuesto la activación de enzimas sulfhidrolasas y sulfotransferasas que provocan la desulfatación de la molécula aumentando los niveles de 3,6-AG y por lo tanto, la calidad del polisacárido (Freile-Peigrín et al. 2002). Mediante el cultivo en oscuridad durante 10 días, Villanueva y colaboradores (2009) establecieron un pre-tratamiento compatible con el medio ambiente, el cual produjo un incremento en las propiedades del gel.

En cuanto a las extracciones en medios ácidos, existen escasas menciones bibliográficas a estos protocolos, probablemente debido que los medios alcalinos son los más utilizados tanto para la industria como en los laboratorios. A modo de resumen, autores como Murano et al. (1997), realizaron extracciones en *Solieria filiformis* y *Agardhiella subulata*, con pretratamientos en medio ácido de 0.1 M HCl, y obtuvieron productividades de carragenano en ambas especies inferiores al 1 %. Por su parte, Ohno y colaboradores (1996) realizaron extracciones en H₂SO₄ al 5%, obteniendo porcentajes de productividad aceptables entre 42.9- 51.9 %. Sin embargo este trabajo presenta deficiencias en cuánto a los detalles de los resultados de acuerdo al tratamiento y el efecto

en la composición química del carragenano, como habíamos descrito previamente. En este sentido autores como Karlsson & Singh (1999) demostraron en su estudio que el carragenano después de una hidrólisis ácida, disminuía su peso molecular a medida que aumentaba la temperatura. Lo que podría explicar el porque este método resultó ser muy agresivo con las muestras.

Siguiendo la línea de exposición, y como hemos mencionado, la concentración de la sal utilizada también influye en la productividad del carragenano. Los trabajos de Freile-Peigrín et al. (2006), en la especie *Eucheuma isiforme* pusieron en evidencia el efecto de concentración de sales en las que utilizaron diferentes concentraciones de KOH (1, 3, 5 y 7% w/v), durante la extracción alcalina. Estos autores reportaron que la productividad disminuía a medida que la concentración del álcali se incrementaba, y ligaban estos datos a lo que ellos consideraban estaba asociado con la degradación del polisacárido como resultado de la concentración del álcali utilizado. Sin embargo Dawes (1977), utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como otro tipo de sal en la misma especie de estudio, obtuvo una productividad de 59.7% a una concentración para esta sal de 12.5 %.

En la formación de geles un requisito importante es la configuración de una doble hélice, que no es más que una

reacción de ciclación que se da como resultado de la extracción alcalina, y viene dada por los iones presentes o sales empleadas en dicha reacción. De esta manera, los iones de potasio, por ejemplo, son capaces de introducirse entre la doble hélice y así neutralizar las cargas de los grupos sulfatos, facilitando la aproximación entre ellos, para la constitución de los geles (Campo et al. 2009). Sin embargo, con iones sodio, al tener un radio hidratado (interacción de tipo electrostático entre las moléculas de agua y el ion) considerablemente grande, no causa el mismo efecto en la aproximación de las moléculas, y se genera geles menos fuertes.

Los geles más fuertes en kappa carragenano son formados por K^+ , más que con Li^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} o Sr^{2+} , debido a su electronegatividad (Kara et al. 2006).

Además de estos factores, otro factor importante es la precipitación, que en muchos trabajos se realiza con solventes orgánicos como alcoholes y cetonas. En su trabajo Muñoz y colaboradores (2004) describen que la utilización de CTAB permite la precipitación del carragenano puro sin la presencia del almidón, el cual llega a ser de hasta un 14% en las carragenofitas.

En cambio la precipitación con alcohol favorece la precipitación de ambos tipos de polisacáridos, por lo que no se obtiene el carragenano puro. En nuestro caso con el método de

Freile-Pelegrín et al. (2006), la precipitación se realiza con CTAB asegurándonos la obtención de carragenano puro; sin embargo el resto de los métodos se precipitó con solventes orgánicos.

Valoración cualitativa del carragenano mediante espectrometría infrarroja.

La técnica del FTIR es utilizada en este estudio para la valoración cualitativa de nuestro carragenano porque, de una manera rápida y fácil, nos permite conocer mediante el espectro generado las bandas correspondientes y contrastarlas con la bibliografía.

A pesar que la interpretación de la sulfatación de los espectros infrarrojos del carragenano, dependen de una evaluación empírica, estos espectros son muy útiles en estudios comparativos de fuentes y tipos de carragenanos (Dawes 1977). El desarrollo de las técnicas infrarrojas ha permitido ahondar en el significado de cada señal y sus interrelaciones, con el fin de obtener la mejor aproximación de la calidad de los ficocolides. En este sentido, estudios de autores como Stancioff & Stanley en 1969, ya señalaban que la banda ancha a $1240-1250\text{ cm}^{-1}$, era común a todos los polisacáridos sulfatados y Dawes (1977) demostró diferentes

niveles o grados de sulfatación. Otros autores como Chopin y colaboradores (1999) indican que las bandas que se presentan entre 1000 y 1240 cm^{-1} están relacionados con la presencia de sulfatos. En esta zona, la mayor intensidad de banda la presentan los lambda carragenanos, puesto que albergan 3 grupos sulfatos por unidad de disacárido; para continuar con los iota carragenanos con dos grupos sulfatos por unidad de disacárido, y el que presenta la banda en menor intensidad que son los kappa carragenano, puesto que, presentan un solo grupo sulfato por unidad de disacárido (Santos 1980). En este sentido, los mayores niveles de éster sulfato implican una menor fuerza de gelificación y baja temperatura de solubilización.

Las variaciones estructurales asociadas a la sulfatación son conocidas por los efectos que produce en las propiedades reológicas tanto del agar, como de los geles del carragenano (Rochas et al. 1986 y referencias contenidas). Así, los métodos de Ohno et al. (1996) (alcalino y ácido) y Fostier et al. (1992) (alcalino) no presentaron bandas relacionadas con los éster-sulfato en esta zona ($1000\text{-}1240\text{ cm}^{-1}$), por lo que puede ser un indicio de la agresividad de los métodos, al eliminarse los grupos sulfatos de la molécula de carragenano.

Inciendiando sobre que los altos contenidos de sulfatos están asociados a la formación de geles débiles, Hurtado-

Ponce (1995) encontró sin embargo una relación inversa, entre el contenido de sulfato del carragenano y la dureza del gel en los morfotipos de *K. alvarezii*. Por el contrario, autores como Wakibia et al. (2006) y Azanza-Corrales & Sa-a (1990) no encontraron una relación significativa entre dureza del gel y contenido de sulfato, para la misma especie. Se cree que la dureza del gel está más relacionado con la longitud de las moléculas de ficocoloides, debido a sus largas cadenas, donde interaccionan unas con otras, para formar geles de alta dureza. El efecto contrario ocurriría en las moléculas de cadenas cortas (Wakibia et al. 2006).

Además del número y grado de sulfatación, otro grupo funcional importante, que pueden diferenciar un tipo de carragenano de otro, es 3,6 anhidrogalactosa, cuya banda se presenta a 930 cm^{-1} (Chopin et al. 1999). La presencia o ausencia de este grupo funcional está relacionado con las propiedades gelificantes del carragenano. El tratamiento alcalino favorece la formación del grupo 3,6 AG, a partir de μ y ν carragenano (precursores de kappa e iota carragenano respectivamente).

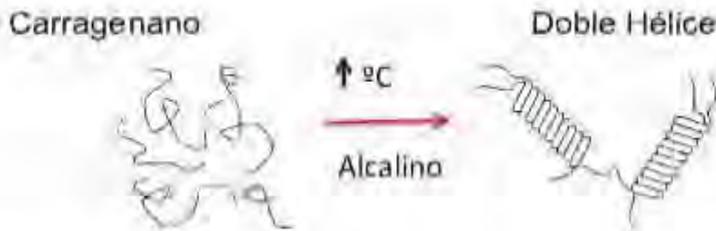


Fig II.7 Formación de la doble hélice del carragenano bajo tratamiento alcalino. (Fuente: Kara et al. 2006).

Esta reacción es comúnmente utilizada a nivel de producción comercial de kappa e iota carragenano, para incrementar el contenido de 3,6 anhidrogalactosa (Agullán et al. 2003). En nuestro caso, los métodos de Ohno et al. (1996) (alcalino y ácido) y Fostier et al. (1992) (alcalino) no presentaron esta banda indicadora de las propiedades gelificantes, por lo que corroboran la escasa calidad de carragenano obtenido con estos métodos.

Algunos autores exponen una relación positiva entre el contenido de 3,6 anhidrogalactosa y dureza de gel, es decir, que a mayor contenido de 3,6 anhidrogalactosa, mayor será la dureza del gel. Otros manifiestan una relación positiva entre dureza del gel y viscosidad, como los reportados por Wakibia et al. (2006) en las especies *Eucheuma denticulatum*, en los

morfotipos verdes y pardos de *Kappaphycus alvarezii* del Sur de Kenia.

Aunque se han reportado relaciones inversas entre dureza de gel y viscosidad (Wakibia et al. 2006 y referencias contenidas), estos parámetros pueden variar, como hemos mencionado anteriormente, en función del tipo de carragenano, su peso molecular y la naturaleza del hidrocólide, la fuente del alga, las condiciones ambientales en las que crecieron, la estación en la que fueron cultivadas, el método de extracción, etc. (Santos 1980; Wakibia et al. 2006).

El análisis de los espectros también nos permite conocer a través de las ratios de absorbancia, entre las diferentes bandas, la proporción de los diferentes formas de carragenano, el grado de hibridación (grado de mezcla de monómeros de disacáridos de dos o más tipos de carragenanos) de nuestra muestra. Una de ellas es la ratio 805/ 845 (Rochas et al. 1986), la cual determina el grado de hibridación de iota/kappa carragenano.

Según Chopin et al. (1990) la banda presente a 845 cm^{-1} corresponde a la galactosa 4 sulfato y corrobora la existencia de mezcla de kappa/iota carragenano. En nuestro estudio, no realizamos ninguna medición de ratios. Sin embargo, muestras identificadas también como *K. alvarezii* de Panamá, fueron analizadas previamente por Pereira et al. (2009b), y presentaron una ratio de iota/kappa de 0.59 a 0.71.

Otras ratios de absorbancia infrarroja para determinar el contenido total de sulfato, fueron 1240/930 (Hillou et al. 2012); el contenido de 3,6 anhidrogalactosa-2 sulfato se obtiene con la ratio 805/2920, característico de iota carragenano y con la ratio 930/2920 se obtiene el contenido de 3,6 anhidrogalactosa y galactosa-4-sulfato, común tanto en kappa e iota carragenano (Cheney et al. 1987).

Los análisis realizados mediante la técnica del FTIR nos confirman que los cultivares de Panamá producen kappa-carragenano y de una calidad y productividad acorde con los reportados en bibliografía. De los métodos de extracción empleados, el método de Freile-Pelegrín et al. (2006) mostró adecuado en la relación cuantitativo vs cualitativo, ya que presentó valores de carragenano aceptables de 68% y un espectro que presenta las bandas características del kappa-carragenano, de manera similar al espectro generado por el kappa-carragenano comercial.

Como describimos anteriormente, la gran variabilidad en cuanto a reactivos, temperaturas, sales y pH, de los métodos de extracción, posiblemente sean esos factores los que influyen las propiedades del carragenano al momento de la extracción, por lo que debemos condicionar el método de extracción que nos permita tener una alta productividad sin perder las propiedades químicas características del carragenano.

CONCLUSIONES

De este capítulo podemos concluir que:

Se han establecido métodos prácticos y fiables de extracción de carragenano en muestras secas, resultando que el análisis de productividad de carragenano y de la técnica del FTIR, son válidos como métodos de análisis de materia prima, a nivel industrial, por su rapidez y fácil aplicación. Podemos afirmar que la técnica del FTIR nos permite distinguir de una manera rápida los grupos funcionales presentes en nuestra muestra de carragenano y conocer a qué tipo pertenece.

Por lo expuesto, podemos concluir que *K. alvarezii* de Panamá tiene una buena calidad de kappa-carragenano atendiendo a los análisis de FTIR y una productividad acorde a lo descrito en la bibliografía como para ser explotada comercialmente.

1. *Kappaphycus alvarezii* de Panamá tiene una buena productividad de carragenano superior al 60%.
2. La técnica del FTIR nos permite distinguir grupos funcionales característicos de kappa carragenano.
3. Los resultados obtenidos en esta tesis deben servir para la incentivación de la I+D+i en la industria de las algas en Panamá.

CONCLUSIONES



1. Se ha amplificado selectivamente el gen *rbcL* de muestras frescas de Panamá, y depositado en las bases de datos del NCBI con N° de acceso HQ612184.
2. La secuenciación del fragmento amplificado ha permitido establecer la especie cultivada como *Kappaphycus alvarezii* (Doty) Doty ex PC Silva.
3. Es posible aplicar las bases de la técnica de AFLP a muestras frescas y secas. Lo segundo puede tener mayor relevancia en la industria.
4. El análisis génico mediante GenAlex revela sutiles diferencias genéticas entre Panamá y la de otros sitios.
5. Hemos podido clonar fragmentos AFLP lo que abre una puerta a su uso en mejora genética.
6. *Kappaphycus alvarezii* de Panamá tiene una buena productividad de carragenano superior al 60%.
7. La técnica del FTIR nos permite distinguir grupos funcionales característicos de kappa carragenano.
8. Los resultados obtenidos en esta tesis deben servir para la incentivación de la I+D+i en la industria de las algas en Panamá.
9. Combinados los resultados del capítulo I y II, los cultivares de *Kappaphycus alvarezii* de Panamá, parecen genéticamente distinguibles, con buena cantidad y calidad de carragenano. Estos resultados podrían sustentar hacia una potencial declaración de denominación de origen.

BIBLIOGRAFÍA



- Abreu MH, Pereira R, Yarish C, Buschmann AH, Sousa-Pinto I (2011) IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: Productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture* 312: 77-87
- Ackloo S, Terlouw J, Ruttink PJA, Burges PC (2001) Analysis of carrageenans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. I. Kappa-carrageenans. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15: 1152-1159
- Aguilan JT, Broom JE, Hemmingson JA, Dayrit FM, Montaña MNE, Dancel MCA, Niñonuevo MR, Furneaux RH (2003) Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. *Bot Mar* 46: 179-192
- Aguirre C, Alvarado R, Hinrichsen P (2005) Identificación de cultivares y líneas de mejoramiento de arroz de Chile mediante Amplificación de Fragmentos Polimórficos (AFLP) *Agr Tec* 65: 356-369
- Alberto F, Santos R, Leitao JM (1997) DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) Populations. *J Phycol* 33: 706-710
- Alberto F, Santos R, Leitao JM (1999) Assessing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. *Mar Ecol Prog Ser* 191: 101-108

- Alcántara MR (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X (eds) Ecología Molecular, México
- Anhalt UCM, Crespo Martínez S, Forneck A (2011) Dynamic grapevine clones-an AFLP-marker study of the *Vitis vinifera* cultivar Riesling comprising 86 clones. Tree Genet Genomes 7: 739-746
- Antoine E & Fleurence J (2003) Species identification of red and brown seaweeds using ITS ribosomal DNA amplification and RFLP patterns. J Sci Food Agric 83: 709-713
- Arnao E, Jayaro Y, Hinrichsen P, Ramis C, Marín C, Pérez Almeida I (2008) Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en Venezuela. Interciencia 33(5): 359-364
- Arvizu-Higuera DL, Rodríguez-Montesinos YE, Murillo-Álvarez JI, Muñoz-Ochoa M, Hernández-Carmona G (2008). Effect of alkali treatment time and extraction time on agar from *Gracilaria vermiculophylla*. J Appl Phycol 20: 515-519
- Asamizu E, Nakajima M, Kitade Y, Saga N, Nakamura Y, Tabata S (2003) Comparison of RNA expression profiles between the two generations of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta), based on expressed sequence tag frequency analysis. J Phycol 39: 923-930

- Ask El & Azanza RV (2002) Advances in cultivation technology of commercial Eucheumatoid species: a review with suggestions for future research. *Aquaculture* 206: 257-277
- Assefa A, Labuschage MT, Viljoen CD (2007) AFLP analysis of genetic relationships between barley (*Hordeum vulgare* L.) landraces from North Shewa in Ethiopia. *Conserv Genet* 8: 273-280
- Averza-Colamarco A, Almodovar LR, Martínez A (2002) Compendio bibliográfico de las algas del Caribe de Panamá: Las algas verdes. *Tecnociencia* 2 (2): 141-160
- Azanza-Corrales A & Sa-a P (1990) The farmed Eucheuma species (Gigartinales, Rhodophyta) in Danajon Reef, Philippines: carrageenan properties. *Hydrobiologia* 204-205: 521-525.
- Baamonde-López S, Baspino I F, Barreiro R L, Cremades J (2007) Is the cryptic alien seaweed *Ulva pertusa* (Ulvales, Chlorophyta) widely distributed along European Atlantic coasts? *Bot Mar* 50: 267-274
- Bailey JC & Freshwater DW (1997) Molecular systematics of the Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid *rbcL* and nuclear SSU gene sequences. *Eur J Phycol* 32: 343-352
- Balaghi S, Mohammadifar MA, Zargaraan A, Gavlighi HA, Mohammadi M (2011) Compositional analysis and

- rheological characterization of gum tragacanth exudates from six species of Iranian *Astragalus*. *Food Hydrocolloid* 25: 1775-1784
- Barreiro R, Quintela M, Bárbara I, Cremades J (2006) RAPD differentiation of *Grateloupia lanceola* and the invasive *Grateloupia turuturu* (Gigartinales, Rhodophyta) in the Iberian Peninsula. *Phycologia* 45(2): 213-217
- Barrios JE (2005) Dispersión del alga exótica *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) en la región nororiental de Venezuela. *Bol Inst Oceanogr Venezuela, Univ Oriente* 44(1): 29-34
- Batista G, Berguido C, Alveo D, (2006) Food and medical uses of marine algae by Kuna Indians on the Caribbean, Panama. *Seaweed Resources of the Panama*. In Critchley AT, Ohno M, Largo DB (eds) *World Seaweeds Resources DVD-ROM*.
- Batista G (2009). Cultivo ecosostenible de *Kappaphycus alvarezii* en Panamá. Tesis Doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- BeMiller JN (2009) One hundred years of commercial food carbohydrates in the United States. *J Agric Food Chem* 57: 8125-8129
- Benzie JAH, Price IR, Ballment E (1997) Population genetics and taxonomy of *Caulerpa* (Chlorophyta) from the Great Barrier Reef, Australia. *J Phycol* 33: 491-504

- Benzie JAH, Ballment E, Edyvane K (2000) Allozyme as genetic identification markers of *Sargassum spp.* (Phaeophyta) from the Great barrier Reef Australia. *Bot Mar* 43: 169-179.
- Bezerra AF & Marinho-Soriano AF (2010) Cultivation of the red seaweed *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) in tropical waters of northeast Brazil. *Biomass Bioenerg* 34: 1813-1817
- Billot C, Boury S, Benet H, Kloareg B (1999) Development of RAPD markers for parentage analysis in *Laminaria digitata*. *Bot Mar* 42: 307-314
- Bixler H & Porse H (2011) A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *J Appl Phycol* 23(3): 321-335
- Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol* 13: 3261-3273
- Bonin A, Francois P, Taberlet P (2005) Use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. *Method Enzymol* 395: 145-160
- Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Mol Ecol* 16: 3737-3758

- Botstein D, White KL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331
- Bouza N (2002) Contribución al conocimiento de las poblaciones naturales de *Gelidium canariensis* (Rhodophyta) desde una perspectiva genética y demográfica. Tesis Doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.
- Brostoff WN & Gordon ME (1997) Allozyme variation in New Zealand Porphyra (Rhodophyta) *N Z J Bot* 35: 203-220
- Buschmann AH, Corre JA, Westermeier R, Hernández-González MC, Norambuena R (2001) Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220
- Campo VL, Kawano DF, da Silba DB, Carvalho I (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis- A review. *Carbohydr Polym* 77:167-180
- Canovas F, Mota C, Ferreira-Costa J, Serra E, Coyer J, Olsen J, Pearson G (2011) Development and characterization of 35 single nucleotide polymorphism markers for the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Eur J Phycol* 46(4): 342-351
- Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Souza BWS, Teixeira JA, Vicente AA (2011) Galactomannans

- use in the development of edible films/ coatings for food applications. Trends food Sci Tech 22: 662-671
- Cervera MT, Remington D, Frigerio JM, Storme V, Ivens B, Boerjan W, Plomion C (2000) Improved AFLP analysis of tree species. Can J For Res 30:1608-1616
- Chandrasekaran S, Nagendran NA, Pandiaraja D, Krishnankutty N, Kamalakannan B (2008) Bioinvasion of *Kappaphycus alvarezii* on corals in the Gulf of Mannar India. Cur Sci 94: 1167-1172
- Chee SY, Wong PK, Wong CL (2011) Extraction and characterization of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. J Appl Phycol 23: 191-196
- Chen X, Gao Y, Zhao N, Zhao T, Zhu M (2009) an AFLP analysis of genetic diversity and structure of *Caragana microphylla* populations in Inner Mongolia steppe, China. Biochem Syst Ecol 37: 395-401
- Cheney DP, Luistro AH, Bradley PM (1987). Carrageenan analysis of tissue cultures and whole plants of *Agardhiella subulata*. Hydrobiologia 151-152: 161-166
- Chiovitti A, Bacic A, Craik D, Munro S, Kraft G, Ming-Long L (1997) Cell wall polysaccharides from Australian red algae of the family Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta): novel, highly pyruvated carrageenans from the genus *Callophycus*. Carbohydr Res 299: 229-243

- Chiovitti A, McManus L, Kraft G, Bacic A, Liao ML (2004) Extraction and characterization of agar from Australian *Pterocladia lucida*. *J Appl Phycol* 16(1): 41-48
- Chopin T, Hanisak MD, Koehn FE, Mollion J, Morcau S (1990) Studies on carrageenans and effects of seawater phosphorus concentration on carrageenan content and growth of *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft and Wynne (Rhodophyceae, Solieriaceae). *J Appl Phycol* 2: 3-16.
- Chopin T, Kerin BF, Mazerolle R (1999) Gigartinales Symposium. Phycocolloid chemistry as a taxonomic indicator of phylogeny in the Gigartinales, Rhodophyceae: A review and current developments using Fourier transform infrared diffuse reflectance spectroscopy. *Phycol Res* 47: 167-188
- Ciancia M, Nosedá MD, Matulewicz MC, Cerezo AS (1993) Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda series. *Carbohydr Polym* 20: 95-98
- Collén J, Roeder V, Rousvoal S, Collin O, Kloareg B, Boyen C (2006) An expressed sequence tag analysis of thallus and regenerating protoplasts of *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyceae) *J Phycol* 42: 104-112

- Comisarow MB & Marshall AG (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem Phys Lett* 25(2): 282-283
- Conklin KY, Kurihara A, Sherwood AR (2009). A molecular method for identification of the morphologically plastic invasive algal genera *Eucheuma* and *Kappaphycus* (Rhodophyta, Gigartinales) in Hawaii. *J App Phycol* 21(6): 691-699
- Costell E, Peyrolón M, Durán L (2000) Note. Influence of texture and type of hydrocolloid on perception of basic tastes in carrageenan and gellan gels. *Food Sci Tech Int* 6(6): 495-499
- Coyer JA, Hoarau G, Beszteri B, Pearson G, Olsen JL (2009) Expressed sequence tag-derived polymorphic SSR markers for *Fucus serratus* and amplification in other species of *Fucus*. *Mol Ecol Resources* 9: 168-170
- Craigie JS & Leigh C (1978) Carrageenan and agar. In: Hellebust JA, Craigie JA (eds) *Handbook of phycological methods: physiological and biochemical methods*. Cambridge University Press, Cambridge pp. 109-131
- Crawford B (2002) Seaweed Farming: An alternative livelihood for small-scale fishers? Narraganset. Coastal Resources Center pp. 1-23.
http://imcafs.org/download/Alt_Livelihood.pdf.

- Cuesta A, Monsalve-Gil J, Mesa M, Zapata A, Trujillo M (2005) Estrategias de cultivo en la producción de alginatos por *Azotobacter vinelandii*. Pub Interna Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- da Silva GA, Lumini E, Maia LC, Bonfante P, Bianciotto V (2006) Phylogenetic analysis of Glomeromycota by partial LSU rDNA sequences. *Mycorrhiza* 16: 183-189
- Dai Y, Whittall RM, Bridges CA, Isogai Y, Hindsgaul O, Li L (1997) Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry for the analysis of monosulfated oligosaccharides. *Carbohydr Res* 304: 1-9
- Dawes CJ (1977) Seasonal and reproductive aspects of plant chemistry, and carrageenan from Floridean Eucheuma (Rhodophyta, Gigartinales) *Bot Mar* XX: 137-147
- Delattre C, Fenoradosa TA, Michaud P (2011) Galactans: An overview of their most important sourcing and applications as natural polysaccharides. *Braz Arch Biol Technol* 54(6): 1075-1092.
- Donaldson SL, Chopin T, Saunders G (1998) Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) as a source of genetic markers for red algae. *J Appl Phycol* 10: 365-370
- Donaldson SL, Chopin T, Saunders G (2000) An assessment of the AFLP method for investigating population structure in the red alga *Chondrus crispus* Stackhouse (Gigartinales, Floridiophyceae). *J Appl Phycol* 12: 25-35

- Dong J, Chen W, Crane JL (1998) Phylogenetic studies of the Leptosphaeriaceae, Pleosporaceae and some other Loculoascomycetes based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycol Res* 102(2): 151-156
- Doty MS (1985) *Eucheuma alvarezii* sp. nov. (Gigartinales, Rhodophyta) from Malaysia. In Abbott IA & Norris JN (eds) *Taxonomy of Economic Seaweeds: with reference to some Pacific and Caribbean species*, pp. 37-65
- Doty MS & Norris JN (1985). *Eucheuma* species (Solieriaceae, Rhodophyta) that are major sources of carrageenan. In Abbott IA & Norris JN (eds) *Taxonomy of Economic seaweeds: with reference to some Pacific and Caribbean species*, pp 47-62
- Drummond AJ, Ashon B, Buxton S, Cheving M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J, Kearse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A (2011) Geneious version v5.4. Available from <http://www.geneious.com/>
- Ekeberg D, Knutsen SH, Sletmoen M (2001) Negative-ion electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) as a tool for analyzing structural heterogeneity in kappa-carrageenan oligosaccharides. *Carbohydr Res* 334: 49-59
- El estado mundial de la pesca y acuicultura 2012. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO,

- Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, Roma, 2012. ISSN 1020-5500
- Escaravage N, Questiau S, Pornon A, Doche B, Taberlet P (1998) Clonal diversity in a *Rhododendron ferrugineum* L (Ericaceae) population inferred from AFLP markers. *Mol Ecol* 7: 975-982
- Fang J, Wang C, Yui H, Zheng Y, Li X, Song C, Chen J (2009) Identification of 57 cultivars of sweet orange cultivars using AFLP markers. *J Hortic Sci Biotech* 84(6): 585-590
- Farias WRL, Valent AP, Pereira MS, Mourao PAS (2000) Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. *J Biol Chem* 275 (38): 29299-29307
- Feng JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246: 64-71
- Fenoradosa TA, Ali G, Delattre C, Laroche C, Petit E, Wadouachi A, Michaud P (2010) Extraction characterization of an alginate from the brown seaweed *Sargassum turbinarioides* Grunow. *J Appl Phycol* 22: 131-137
- Flanagan NS (2005) A guide to GenAEx 6. Genetic Analysis in Excel. The Australian National University, Canberra, Australia

<http://biology.anu.edu.au/GenAIEx/espanol/GenAIEx6%20manual-espanol.pdf>

- Foscarini R, Prakash J (1990). Handbook on Euchuema cultivation in Fiji. Ministry of Primary Industries, Fisheries Division (Fiji) and South Pacific Aquaculture Development Project, (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Suva, Fiji May. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AC287E/AC287E00.HTM>.
- Fostier AH, Kornprobst JM, Combaut G (1992) Chemical composition and rheological properties of carrageenas from two Senegalese Solieriaceae *Anatheca montagnei* Schmitz and *Meristotheca senegalensis* Feldmann. Bot Mar 35: 351-355
- Fournet I, Zinoun M, Deslandes E, Diouris M, Floc'h JY (1999) Floridean starch and carrageenan contents as responses of the red alga *Solieria chordalis* to culture conditions. Eur J Phycol 34: 125-130
- Fredericq S, Hommersand MH, Freshwater DW (1996). The molecular systematics of some agar –and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. Proceedings XVth int Seaweed Symp. Hydrobiologia 326-327 (1): 125-135
- Fredericq S, Freshwater DW, Hommersand (1999) Observations on the phylogenetic systematics and

- biogeography of the Solieriaceae (Rhodophyta, Gigartinales) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398-399: 25-38
- Freile-Peigrín Y, Robledo D, Pedersén M, Bruno M, Rönnqvist J (2002) Efecto del tratamiento de oscuridad y salinidad en el rendimiento y calidad del agar de *Gracilaria cornea* (Rhodophyceae). *Ciencias Marinas* 28(3): 289-296
- Freile-Peigrín Y, Robledo D, Azamar JA (2006) Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, México. I. Effect of extraction conditions. *Bot Mar* 49: 65-71
- Freile-Peigrín Y, Robledo D, Chan-Bacab MJ, Ortega-Morales BO (2008) Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia* 79: 374-377
- Freshwater DW & Rueness J (1994) Phylogenetic relationships of some European Gelidium (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycol* 33(3): 187-194
- Freshwater DW, Fredericq S, Butler BS, Hommersand MH, Chase MW (1994) Agene phylogeny of the Red Algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL* sequences. *Proc Natl Acad Sci* 91: 7281-7286
- Friedlander M (2008) Advances in cultivation of Gelidiales. *J App Phycol* 20: 451-456

- Fukuyama Y, Ciancia M, Nonami H, Cerezo AS, Era-Balsells R, Matulewicz MC (2002) Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated neocarrabiose oligosaccharides. *Carbohydr Res* 337: 1553-1562
- Galla NR & Dubasi GR (2010) Chemical and functional characterization of gum karaya (*Sterculia urens* L.) seed meal. *Food Hydrocolloid* 24(5): B479-485
- García-Jiménez P, Geraldino PL, Ming Boo S, Robaina RR (2008). Red alga *Grateloupia imbricata* (Halymeniaceae), a species introduced into the Canary Islands. *Phycol Res* 56: 166-171
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphism to non-model species: a technical review. *Mol Ecol Resources* 10(6): 915-934
- Gavio B & Fredericq S (2002) *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) is the correct name of the non-native species in the Atlantic known as *Grateloupia doryphora*. *Eur J Phycol* 37: 349-360
- Gellenbeck K (2011) Utilization of algal materials for nutraceuticals and cosmeceutical applications- what to do manufacturers need to know? *J Appl Phycol* pp. 1-5
<[doi:10.1007/s10811-011-9722-z](https://doi.org/10.1007/s10811-011-9722-z)>
- Geuna F, Toschi M, Bassi D (2003) The use of AFLP markers for cultivar identification in apricot. *Plant Breeding* 122:

526-531

- González-Fortes GM (2008) Desarrollo de un mapa genético con marcadores AFLP y microsatélites en rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.). Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela
- Götz J, Zick K, Hinrichs R, Weisser H (2004) 218: 323-332
Characterization of carrageenan and whey protein gels using NMR PGSTE diffusion experiments. Eur Food Res Technol 218: 323-332
- Grodzicker T, Williams J, Sharp P, Sambrook J (1974) Physical mapping of temperature sensitive mutations. Cold Spring Harbor Symp Quart Biol 39: 439-446
- Guilemin ML, Destombe C, Faugeron S, Correa A, Valero M (2005) Development of microsatellites DNA markers in the cultivated seaweed, *Gracilaria chilensis* (Gracilariales, Rhodophyta). Mol Ecol Not 5: 155-157
- Guiry MD & Guiry GM (2011) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on October 2011
- Hansen M, Kraft T, Christiansson M, Nilsson NO (1999) Evaluation of AFLP in Beta. Theor Appl Genet 98:845-852
- Hartings H, Berardo N, Mazzinelli GF, Valoti P, Verderio A, Motto M (2008) Assessment of genetic diversity and

- relationships among maize (*Zea mays* L.) Italian landraces by morphological traits and AFLP profiling. *Theor Appl Genet* 117(6): 831-842
- Harvey DJ (2005) Structural determination of N-linked glycans by matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry. *Proteomics* 5: 1774-1786
- Hayashi L, de Paula EJ, Chow F (2007a) Growth rate and carrageenan analyses in four strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) farmed in the subtropical waters of Sao Paulo State, Brazil. *J Appl Phycol* 19: 393-399
- Hayashi L, Oliveira EC, Bleicher-Lhonneur G, Boulenguer P, Pereira RTL, von Seckendorff R, Shimoda VT, Leflamand A, Vallée P, Critchley AT (2007b). The effects of selected cultivation conditions on the carrageenan characteristics of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) in Ubata Bay, Sao Paulo, Brazil. *J Appl Phycol* 19: 505-511
- Hayashi L, Hurtado AQ, Msuya FE, Bleicher-Lhonneur G, Critchley AT (2010) A review of *Kappaphycus* farming: prospects and constraints. In: Israel A, Eivav R, Seckbach J (eds) *Seaweeds and their role in globally changing environments*, Springer New York, pp. 251-283

- Hayashi L & Reis R (2012) Cultivation of the red algae *Kappaphycus alvarezii* in Brazil and its pharmacological potential. *Rev Bras Farmacogn* 22(4): 748-752
- Hernández-Carmona G, McHugh DJ, López-Gutiérrez F (1999) Pilot plant scale extraction of alginates from *Macrocystis pyrifera*. 2. Studies on extraction conditions and methods of separating the alkaline-insoluble residue. *J Appl Phycol* 11: 493-502
- Hillou L, Larotonda FDS, Abreu P, Ramos AM, Sereno AM, Gonçalves MP (2006) Effect of extraction parameters on the chemicals structure and gel properties of k/i- hybrid carrageenans obtained from *Mastocarpus stellatus*. *Biomol Eng* 23: 201-208
- Hillou L, Larotonda FDS, Abreu P, Abreu MH, Sereno AM, Gonçalves MP (2012) The impact of seaweed life phase and postharvest storage duration on the chemical and rheological properties of hybrid carrageenans isolated from Portuguese *Mastocarpus stellatus*. *Carbohydr Res* 87: 2655-2663
- Hoffman RA, Gidley MJ, Cooke D, Frith W (1995) Effect of isolation proceeding on the molecular composition and physical properties of *Eucheuma cottonii* carrageenan. *Food Hydrocolloid* 9(4):281-289
- Hsu TW, Tsai WC, Wang DP, Lin S, Hsiao YY, Chen WH, Chen HH (2008) Differential gene expression analysis by

- cDNA-AFLP between flower buds of *Phalaenopsis* Hsiang Fei cv. H. F. and its somaclonal variant. *Plant Sci* 175: 415-422
- Hughey JR, Silva PC, Hommersand MH (2001) Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinales (Rhodophyta) using DNA from type material. *J Phycol* 37: 1091-1109
- Hurtado-Ponce AQ (1995) Carrageenan properties and proximate composition of the three morphotypes of *Kappaphycus alvarezii* Doty (Gigartinales, Rhodophyta) grown at two depths. *Bot Mar* 38: 215-219
- Hurtado AQ, Critchley AT, Trespoy A, Bleicher-Lhonneur (2008) Growth and carrageenan quality of *Kappaphycus striatum* var. sacol grown at different stocking densities, duration of culture and depth. *J Appl Phycol* 20: 551-555
- Hurtado AQ, Montaña MNE, Martínez-Goss MR (2012) Commercial production of carrageenophytes in the Philippines: ensuring long-term sustainability for the industry. *J Appl Phycol* <[doi: 10.1007/s10811-012-9945-7](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9945-7)>
- Ilgin M, Kafkas S, Ercisli S (2009) Molecular characterization of plum cultivars by AFLP. *Biotechnol Biotechnol Eq* 23(2): 1189-1193
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J Mol Ecol* 32: 128-144

- Israel A, Gavrieli J, Glazer A, Friedlander M (2005) Utilization of flue gas from a power for tank cultivation of the red seaweed *Gracilaria cornea*. *Aquaculture* 249: 311-316
- Israel A, Levy I, Friedlander M (2006) Experimental tank cultivation of *Porphyra* in Israel. *J App Phycol* 18: 235-240
- Iyer R, Tronchin M, Bolton JJ, Coyne VE (2005) Molecular systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with emphasis on Southern Africa. *J Phycol* 41: 672-684
- Johnson FM, Kanapi CG, Richardson RH, Wheeler MR, Stone WS (1966) An analysis of polymorphisms among isozyme loci in dark and light *Drosophila ananassae* strains from America and Western Samoa. *Proc Natl Acad Sci* 56: 119-125
- Kamiya M, West JA, King RJ, Zuccarello GC, Tanaka J, Hara Y (1998) Evolutionary divergence in the red algae *Caloglossa leprieurii* and *C. apomeiotica*. *J Phycol* 34(2): 361-370
- Kara S, Arda E, Kavzak B, Pekcan O (2006) Phase transitions of k-carrageenan gels in various types of salts. *J Appl Polym Sci* 102: 3008-3016
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F (1985) Influence of the wave length in high-irradiance ultraviolet laser desorption

- mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* 57: 2935-44
- Karas m, Bahr U, Dülcks (2000) Effect of different solution flow rates on analyte ion. Signals in nano-ESI MS. *J Anal Chem* 366: 669-676
- Karlsson A & Singh SK (1999) Acid hydrolysis of sulphated polysaccharides. Desulphation and the effect on molecular mass. *Carbohyd Polym* 38(1): 7-15
- Kobayashi N, Kumagai M, Minegishi D, Tamarura K, Aotsuka T, Katakura H (2010) Molecular population genetics of a host-associated sibling species complex of Phytophagous ladybird beetles (Coleptera, Coccinellidae, Epilachninae). *J Zool Syst Evol Res* 49(1): 16-24
- Kurihara A, Abe T, Tani M, Sherwood AR (2010) Molecular phylogeny and evolution of red algal parasites: a case study of *Benzaitenia*, *Janczewskia*, and *Ululania* (Ceramiales). *J Phycol* 46: 580-590
- Kusumo HT, Pfister CA, Wootton T (2004) Dominant (AFLP) and co-dominat (microsatellite) markers for the kelp *Postelsia palmaeformis* (Laminariales). *Mol Ecol Notes* 4: 372-375
- Lahaye M (2001) Developments on gelling algal galactans, their structure and physic-chemistry. *J Appl Phycol* 13: 173-184

- Lee SR, Oak JH, Keum YS, Lee JA, Chun IK (2011) Utility of *rbcS* gene as a novel target DNA region for brown algal molecular systematics. *Phycol Res* 59: 34-41
- Li J, Goldman-Huertas B, DeYoung J, Alexander J (2012) Phylogenetics and Diversification of *Syringa* inferred from nuclear and plastid DNA sequences. *Castanea* 77(1): 82-88
- Liu F, Wang X, Liu J, Fu W, Duan D, Yang Y (2009) Genetic mapping of the *Laminaria japonica* (Laminariales, Phaeophyta) using amplified fragment length polymorphism markers. *J Phycol* 45: 1228-1233
- Liu F, Shao Z, Zhang H, Liu J, Wang X, Duan D (2010) QTL Mapping for frond length and width in *Laminaria japonica* Aresch (Laminariales, Phaeophyta) using AFLP and SSR markers. *Mar Biotechnol* 12(4): 386-324
- Liu F, Wang F, Duan D (2012) EST-SSR markers derived from *Laminaria digitata* and its transferable application in *Saccharina japonica*. *J Appl Phycol* 24: 501-505
- Liu F, Yao J, Wang X, Repnikova A, Galanin DA, Duan D (2012) Genetic diversity and structure within and between wild and cultivated *Saccharina japonica* (Laminariales, Phaeophyta) revealed by SSR markers. *Aquaculture* 358-359:139-145
- Liu ZJ & Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-

37

- Lluisma AO & Ragan MA (1995) Relationships among *Eucheuma denticulatum*, *Eucluema isiforme* and *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta) based on nuclear ssu-rRNA gene sequences. *J App Phycol* 7: 471-477
- Lobban CS & Harrison PJ (1997) *Seaweed Ecology and physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 366p
- Lüning K & Pang S (2003) Mass cultivation of seaweeds: current aspects and approaches. *J App Phycol* 15: 115-119
- Maggs CA, Douglas SE, Fenety J, Bird C (1992) A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J Phycol* 28(2): 214-232
- Maneiro I, Couceiro L, Bárbara I, Cremades J, Ruiz JM, Barreiro R (2011) Low genetic variation and isolation of northern peripheral populations of a red seaweed (*Grateloupia lanceola*). *Aquatic Conserv Mar Freshw Ecosyst* 21: 590-600
- Manikoth R, Kanungo I, Fathima NN, Rao JR (2012) Dielectric behavior and pore size distribution of collagen-guar gum composites: Effect of guar gum. *Carbohyd Polym* 88: 628-637

- Maoxin T, Zongyun W, Chaoyuan W (1988) Effects of tissue age and season on the content and composition of carrageenan in *Eucheuma* species. In: Stadler T, Mollion J, Verdus MC, Karamanus Y, Movan HA (eds) *Algal Biotechnology*. Elsevier Applied Science, London, pp. 383-393
- Mathieson AC, Norton TA, Neushul M (1981) The taxonomic implications of genetic and environmentally induced variations in seaweed morphology. *Bot Rev* 47(3): 313-339
- Mba C & Tohme J (2005). Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: Zimmer EA, Roalson EH (eds) *Methods in Enzymology, Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B 395*: 177-201, Elsevier Academic Press, New York
- McCandless EL, Okada WT, Lott JNA, Vollmer CM, Gordon-Mills EM (1976) Structural studies of *Chondrus crispus*: the effect of extraction of carrageenan. *Can J Bot* 55: 2053-2064
- McHugh DJ (2002) Prospects for seaweed production in developing countries. *FAO Fisheries Technical Circular*. N° 968. Rome, FAO, 28pp
- McHugh DJ (2003) A guide to the seaweed industry. *FAO Fisheries Technical Paper*, N° 441 Rome, FAO, 105 pp
- Medero VR, Escobar R, Gallego G, Tohme J, Beovidez Y,

- Rodríguez S, Gómez R (2002) Determinación por AFLP de la estabilidad genética de plantas de yuca obtenidas por embriogenesis somática y organogenesis. *Biotechnol Veg* 2(4): 245-247
- Mehta R, Sharma V, Sood A, Sharma M, Sharma RK (2011) Induction of somatic embryogenesis and analysis of genetic fidelity of in vitro-derived plantlets of *Bambusa nutans* Wall. using AFLP. *Eur J Forest Res* 130: 729-736
- Melo RA (1998) Gelidium commercial exploitation: natural resources and cultivation. *J Appl Phycol* 10: 303-314
- Mendoza WG, Garzon-Fortes ET, Villanueva RD, Romero JB, Montaña MNE (2006) tissue age as a factor affecting carrageenan quantity and quality in farmed *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty ex Silva. *Bot Mar* 49: 57-64
- Mendoza WG, Montaña NE, Ganzon-Fortes ET, Villanueva RD (2002) Chemical and gelling profile of *ice-ice* infected carrageenan from *Kappaphycus striatum* (Schmitz) Doty "sacol" strain (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 14: 409-418
- Meynard AP, Palma RE, Rivera-Milla E (2002) Phylogeographic relationships of the Chilean llacas of the genus *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) based on sequences of the cytochrome b mitochondrial gene. *Rev Chile Hist Nat* 75: 299-306

- Miranda-Medina A, Peralta-Peláez L, González-Valdés A, García-Hernández M, Sánchez-García M (2008) Diseño de una planta productora de ácido alginico y alginates a partir de *Azotobacter vinelandii*. *Tecnol Ciencia Ed* 23(2): 91-98
- Moghaddam TM, Razavi SM, Emadzadeh B (2011) Rheological interactions between *Lallemantia royleana* seed extract and selected food hydrocolloids. *J Sci Food Agric* 91(6): 1083-91.
- Monro K & Poore AGB (2009) Performance benefits of growth-form plasticity in a clonal red seaweed. *Biol J Linn Soc* 97: 80-89
- Montolalu RI, Tashiro Y, Matsukawa S, Ogawa H (2008) Effects of extraction parameters on gel properties of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). *J Appl Phycol* 20: 521-526
- Morris ER, Nishinari K, Rinaudo M (2012) Gelation of gellan- a review. *Food Hydrocolloid* 28: 373-411
- Muñoz J, Freile-Pelegrín Y, Robledo D (2004) Mariculture of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Solieriaceae) color strains in tropical waters of Yucatan, México. *Aquaculture* 239: 161-177
- Murano E, Toffanin R, Cecere E, Rizzo R, Knutsen SH (1997) Investigation of the carrageenans extracted from *Solieria*

- siliformis* and *Agardhiella subulata* from Mar Piccolo, Taranto. Mar Chem 58: 319-325
- Murphy NE & Schaffelke B (2003) Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) as a new tool to explore the invasive green alga *Caulerpa taxifolia* in Australia. Mar Ecol Prog Ser 246: 307-310
- Niwa K, Kikuchi N, Iwabuchi M, Aruga Y (2004) Morphological and AFLP variation of *Porphyra yezoensis* Ueda form *narawaensis* Miura (Bangiales, Rhodophyta). Phycol Res 52: 180-190
- Notoya M (2010) Production of biofuel by macroalgae with preservation of marine resources and environment. In: Israel A, Eivav R, Seckbach J (eds) Seaweeds and their role in globally changing environments, Springer New York, pp. 217-228
- O'Hanlon PC & Peakall R (2000) A simple method for the detection size homoplasy among amplified fragment length polymorphism fragments. Mol Ecol 9: 815-816
- Ohno M, Nang HQ, Hirase S (1996) Cultivation and carrageenan yield and quality of *Kappaphycus alvarezii* in the Waters of Vietnam. J Appl Phycol 8: 431-437
- Oliveira EC (1998) The seaweed resources of Brazil. In Critchley AT & Ohno M (eds) Seaweed Resources of the World pp 366-371 (JICA), Yokosuka, Japan.

- Palacio-López K, Rodríguez-López N (2008) Plasticidad fenotípica en *Lippia alba* (verbenaceae) en respuesta a la disponibilidad hídrica en dos ambientes lumínicos. *Acta Biol Colomb* 13 (1): 187-198
- Pareek M, Mishra A, Jha B (2010) Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *J Phycol* 46: 1322-1328
- Park Y & Lebrilla C (2005) Application of fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry to oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev* 24: 232-264
- Pasquel A (2001) Gomas: Una aproximación a la industria de alimentos. *Rev Amazon Invest Alim* 1(1): 1-8
- Peakall R & Smouse PE (2006) GenAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Note* 6: 288-295
- Pereira L, Sousa A, Coelho H, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA (2003) Use of FTIR, FT-Raman and C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids. *Biomol Eng* 20: 223-228
- Pereira L, Amado AM, Critchley AT, van de Velde F, Ribeiro-Claro PJA (2009a) Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloid* 23: 1903-1909

- Pereira L, Crtchley AT, Amado AM, Ribeiro-Claro PJA (2009b) A comparative analysis of phycocolloids produced by underutilized versus industrially utilized carrageenophytes (Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 21: 599-605
- Picca A, Helguera M, Salomón N, Carrera A (2004) Marcadores moleculares. En: Echenique V, Rubinstein C, Mroginski L (eds) *Biología y mejoramiento vegetal*. Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la biotecnología. Argentina pp. 61-68
- Prasad NJ, Furneaux RH, Hemmingson JA, Miller IJ, Pickering TD, Sotheeswaran S (2003) The carrageenan from the tropical South Pacific red seaweed *Meristotheca procumbens* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Rotuma Island. In: Chapman ARO, Anderson RJ, Vreeland VJ, Davison IR (eds) *Proceedings 17th International Seaweed Symposium*. Cape Town. Oxford University Press, Oxford, pp. 193-200
- Prasad K, Goswami AM, Meena R, Ramavat BK, Ghosh P, Siddhanta AK (2006) Superior quality agar from red alga *Gelidiella acerosa* (Rhodophyta, Gelidiales) from Gujarat coast of India: An evaluation. *Indian J Mar Sci* 35(3): 268-274
- Prasad U, Deshmukhe G, Dwivedi A, Singh SD (2009) Detection of genetic variation in four *Ulva* species based

- on RAPD technique. *Indian J Mar Sci* 38(1): 52-56
- Provan J, Glendinning K, Kelly R, Maggs CA (2013) Levels and patterns of population genetic diversity in the red seaweed *Chondrus crispus* (Florideophyceae): a direct comparison of single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Biol J Linn Soc* 108(2): 251-262
- Provan J, Murphy S, Maggs CA (2004) Universal plastid primers for Chlorophyta and Rhodophyta. *Eur J Phycol* 39(1): 43-50
- Qui D, Huang L, Liu S, Lin S (2011) Nuclear, mitochondrial and plastid gene phylogenies of *Dinophysis miles* (Dinophyceae): Evidence of Variable Types of Chloroplasts. *PLoS ONE* 6(12): e29398. [doi:10.1371/journal.pone.0029398](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029398)
- Robba L, Russell SJ, Barker GL, Brodie J (2006) Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am J Bot* 93: 1101-1108
- Robledo D & Freile-Pelegrín Y (2011) Prospects for the cultivation of economically important carrageenophytes in Southeast Mexico. *J Appl Phycol* 23: 415-419
- Rochas C, Lahaye M, Yaphe W (1986) Sulphate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. *Bot Mar* 29: 335-340
- Roeder V, Collén J, Rousvoal s, Corre E, Leblanc C, Boyen C

- (2005) Identification of stress gene transcripts in *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) protoplast cultures by expressed sequence tag analysis. *J Phycol* 41: 1227-1235
- Rogers LJ, Shah SPJ, Goodwin TW (1966) Mevalonate-Kinase isoenzymes in plant cells. *Biochem J* 100 (2): 14-17
- Rosenbohm C, Lundtl, Christensen TMIE, Young NWG (2003) Chemically methylated and reduced pectins: preparation, characterization by ¹H NMR spectroscopy, enzymatic degradation and gelling properties. *Carbohydr Res* 338: 637-649.
- Rui L, Jiajun L, Chaoyuan W (1990) Effect of ammonium on growth and carrageenan content in *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204-205: 499-503
- Sánchez-Chiang N, & Jiménez VM (2009). Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. *Agron Mesoam* 20: 135-151
- Santos GA (1980) Quality of carrageenan and agar. Symposium on Useful Algae Pacific Grove, CA (USA) pp. 123-129
- Santos GA (1989) Carrageenans of species of *Eucheuma* J. Agardh and *Kappaphycus* Doty (Solieriaceae, Rhodophyta). *Aquat Bot* 36: 55-67

- Saunders GW (2005) Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Phil Trans R Soc B* 360: 1879-1888
- Schmid J, Meyer V, Sieber V (2011) Scleroglucan: biosynthesis, production and application of a versatile hydrocolloid. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 937-947.
- Schmidt A, Bahr U, Karas M (2001) Influence of pressure in the first pumping stage on analyte desolvation and fragmentation in nano-ESI MS. *Anal Chem* 73: 6040-6046
- Schlötterer C (2004) The evolution of molecular markers-just a matter of fashion? *Nature Rev Genet* 5 (1): 63-69
- Scott KD, Ablett EM, Lee LS, Henry RJ (2000) AFLP markers distinguishing an early mutant of flame seedless grape. *Euphytica* 113(3): 245-249
- Semagn K, Bjørnstad A, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotechnol* 5(25): 2540-2568
- Sensi E, Vignani R, Rhode W, Biricolti S (1996) Characterization of genetic biodiversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR marker technology. *Vitis* 35(4): 183-188
- Shan TF, Pang SJ, Zhang YR, Yakovleva IM, Skriptsova V (2011) An AFLP-based survey of genetic diversity and relationships of a major farmed cultivars and

- geographically isolated wild populations of *Saccharina japonica* (Phaeophyta) along the northwest coast of the Pacific. *J Appl Phycol* 23: 35-45
- Sharma S, Sudheer PDVN, Vijayananda KG, Reddy MP (2011) Assessment of genetic stability in micropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Ind Crop Prod* 34: 1003-1009
- Sherwood AR & Presting GG (2007) Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in Eukariotic algae and Cyanobacteria. *J Phycol* 43(3): 605-608
- Shi Y, Yang G, Liu Y, Liao M, Li X, Cong Y (2007) Development of 18 polymorphic microsatellite DNA markers of *Laminaria japonica* (Phaeophyceae). *Mol Ecol Not* 7: 620-622
- Sim MC, Lim PE, Gan SY, Phang SM (2007) Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker for differentiating male from female and sporophytic thalli of *Gracilaria changii* (Rhodophyta) *J Appl Phycol* 19: 763-769
- Smith AH (1998) The seaweed resources of the Caribbean. In: Critchley AT & Ohno M (eds) *Seaweed Resources of the World*. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, pp. 99-105
- Sosa PA, Valero M, Batista F, González-Pérez MA (1998) Genetic structure of natural populations of *Gelidium*

- species: A re-evaluation of results. *J App Phycol* 10: 279-284
- Sosa P & Lindstrom s (1999) Isozymes in macroalgae (seaweeds): genetic differentiation, genetic variability and applications in systematics. *Eur J Phycol* 34 (5): 427-442
- Souza BWS, Cerqueira MA, Bourbon AI, Pinheiro AC, Martins JT, Teixeira JA, Coimbra MA, Vicente AA (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocolloid* 27: 287-292
- Stanley MS, Perry RM, Callow JA (2005) Analysis of expressed sequence tags from the green alga *Ulva linza* (Chlorophyta). *J Phycol* 41: 1219-1226
- Stortz CA (1995) Determinación estructural de polisacáridos de algas: Métodos Espectroscópicos. En: Alveal K, Ferrariro ME, Oliveira EC, Sar E (eds) *Manual de Métodos Ficológicos* (728-749) Universidad de Concepción, Concepción Chile
- Sullivan J, Abdo Z, Joyce P, Swofford DL (2005) Evaluating the performance of a successive approximations approach to maximum-likelihood phylogeny estimation. *Mol Biol Evol* 22: 1386-1392
- Sun JW, Jin DM, Zhou CH, Yang QK, Weng ML, Duan DL, Xu P, Ma JH, Wang B (2005) Identification of *Porphyra* lines

- (Rhodophyta) by AFLP DNA fingerprinting and molecular markers. *Plant Mol Biol Rep* 23: 251-262
- Surey-Gent S & Morris G (1987) *Seaweed: a user's guide*. Whittet books, London, 160p
- Swofford DL (2002). *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) Version 4.0b10*. Sinauer Associates, Sunderland MA, USA
- Tan J, Lim PE, Phang SM, Hong DD, Sunarpi H, Hurtado AQ (2012) Assessment of four molecular markers as potencial DNA barcodes for red algae *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J. Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) *PLoS ONE* 7(12) e52905 <[doi:10.1371/journal.pone.0052905](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052905)>
- Tan J, Lim PE, Phang SM (2013) Phylogenetic relationship of *Kappaphycus* Doty and *Eucheuma* J Agardh (Solieriaceae, Rhodophyta) in Malaysia. *J Appl Phycol* 25(1): 13-29
- Taylor PR & Hay ME (1984) Functional morphology of intertidal seaweeds: adaptive significance of aggregate vs. solitary forms. *Mar Ecol Prog Ser* 18: 295-302
- Teasdale B, West A, Taylor H, Klein A (2002) A simple restriction fragment length polymorphism (RFLP) assay to discriminate common *Porphyra* (Bangiophyceae, Rhodophyta) taxa from the Northwest Atlantic. *J App Phycol* 14: 293-298

- Titlyanov EA & Titlyanova TV (2010) Seaweed cultivation: methods and problems. *Russ J Mar Biol* 36 (4): 227-242
- Tourova TP & Spiridonova EM (2009) Phylogeny and Evolution of the ribulose 1,5-biphosfate carboxylase/oxygenase genes in Prokaryotes. *Mol Biol* 43(5): 713-728
- Turan G & Neori A (2010) Intensive seaweed aquaculture: a potent solution. In: Israel A, Eivav R, Seckbach J (eds) *Seaweeds and their role in globally changing environments*, Springer New York, pp. 359-373
- Tye RJ (1989). Industrial and non-food uses for carrageenan. *Carbohydr Polym* 10(4): 259-280
- Upadhay A, Aher LB, Karibasappa GS (2011) Detection of variation among clonal selections of grapevine (*Vitis vinifera* L.) 'Kishmish Chernyi' by AFLP analysis. *J Hortic Sci Biotech* 86(3): 230-234
- Vairappan CS (2006) Seasonal occurrences of epiphytic algae on the commercially cultivated red alga *Kappaphycus alvarezii* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta. *J App Phycol* 18: 611-617
- ValentinK & Zetsche K (1989) The genes of both subunits of ribulose 1,5 biphosfate carboxylase constitute an operon on the plastome of a red alga. *Curr Genet* 16(3): 203-209
- van de Velde F (2008) Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloid* 22: 727-734

- Villanueva RD & Montaña MNE (2003) Fine chemical structure of carrageenan from the commercially cultivated *Kappaphycus striatum* (sacol variety) (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *J Phycol* 39: 513-518
- Villanueva RD, Hillou L, Sous-Pinto I (2009) Postharvest culture in the dark: An eco-friendly alternative to alkali treatment for enhancing the gel quality of κ/ ι - hybrid carrageenan from *Chondrus crispus* (Gigartinales, Rhodophyta). *Bior Tech* 100: 2633-2638
- Villanueva RD, Romero JB, Montaña MNE, Peña PO (2011) Harvest optimization of four *Kappaphycus* species from the Philippines. *Biomass Bioenerg* 35: 1311-1316
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407-4414
- Wakibia JG, Bolton JJ, Keats DW, Raitt LM (2006) Seasonal changes in carrageenan yield and gel properties in three commercial eucheumatoids grown in Southern Kenya. *Bot Mar* 49: 208-215
- Wang H, Ooi EV, Ang P (2007) Antiviral polysaccharides isolated from Hong Kong brown seaweed *Hydroclathrus clathratus*. *Sci China Ser C* 50 (5): 611-618
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ (2009) "Jalview Version 2- a multiple sequence

- alignment editor and analysis workbench". *Bioinformatics* 25(9): 1189-1191<[doi: 10.1093/bioinformatics/btp033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033)>
- Webber V, Carvalho SM, Manique PL (2012) Molecular and rheological characterization of carrageenan solutions extracted from *Kappaphycus alvarezii*. *Carbohydr Polym* 90: 1744-1749
- Werner R, Olschewski J, Mergenhagen D (2001) Identification and cloning of amplified fragment length polymorphism markers linked to the mating type locus of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J Phycol* 37: 427-432
- White TL, Adams WT, Neale DB (2007) *Forest Genetics*. Cambridge, MA, USA.
- Williams JGK, Kubelik KAR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
- Wilm M & Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 68(1): 1-8
- Wiriyadamrikul J, Park JK, Lewmanomont K, Boo SM (2010) Additional records of *Gelidiella fanii* (Gelidiales, Rhodophyta) from the western Pacific base don morphology, *rbcl* and *cox1* analyses. *Bot Mar* 53: 343-350

- Wong TKM, Ho CL, Lee WW, Rahim RA, Phang SM (2007) Analyses of expressed sequence tags from *Sargassum binderi* (Phaeophyta). *J Phycol* 43: 528-534
- Yanagisawa M, Nakamura K, Ariga O, Nakasaki K (2011) Productions of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochemistry* 46 (11): 211-2116
- Yang G, Sun Y, Shi Y, Zhang L, Guo S, Li B (2009) Construction and characterization of a tentative amplified fragment length polymorphism-simple sequence repeat linkage map of *Laminaria* (Laminariales, Phaeophyta). *J Phycol* 45: 873-878
- Yapo BM (2011) Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins- A new hypothetical model. *Carbohydr Polym* 86: 373-385
- Yi H, Sui Z, Bao Z (2010) Preliminary analysis of population genetic diversity of cultivated *Laminaria japonica* via AFLP technique. *J Ocean Univ China* 9(1): 53-58
- Yow YY, Lim PE, Phang SM (2011) Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia base don mitochondrial *cox1* gene analysis. *J Appl Phycol* 23: 219-226
- Zamfir A, Seidler D, Kresse H, Peter-Katalinic J (2003) Structural investigation of chondroitin/dermatan sulfate

- oligosaccharides from human skin fibroblast decorin. *Glycobiology* 13: 733-742
- Zertuche-González JA (1993) Situación actual del cultivo de agarofitas en América Latina y el Caribe. Proyecto Aquila II, Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura, México, DF Octubre 1993
- Zuccarello GC, West JA, Kamiya M, King RJ (1999a) A rapid method to score plastid haplotypes in red seaweeds and its use determining parental inheritance of plastids in the red alga *Bostrychia* (Ceremiales). *Hydrobiologia* 401: 207-214
- Zuccarello GC, Burger G, West JA, King RJ (1999b) A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Mol Ecol* 8(9): 1443-1447
- Zuccarello GC, Critchley AT, Sieber V, Lhonneur GB, West JA (2006) Systematics and genetic variation in commercial *Kappaphycus* and *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *J App Phycol* 18 (3-5): 643-651

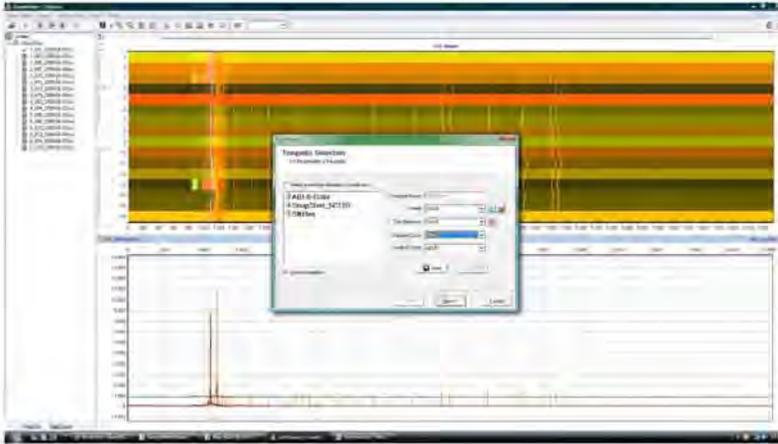
ANEXOS



Guía de uso rápido para el GeneMarker

El GeneMarker® de Softgenetics, LLC (State College, PA, USA) es un software de análisis de genotipo único, que integra nuevas tecnologías para mejorar la velocidad, precisión y facilidad de análisis. En cuanto al análisis de datos de AFLP con el GeneMarker tiene tres opciones detalladas a continuación. EL *Bin table* genera una tabla muy útil para la identificación de la posición de los alelos comunes a los datos y también fácilmente muestra las bandas no comunes. El *Trace comparison* es útil para identificar longitudes de polimorfismo entre especies cercanamente relacionadas, y esto lo hace utilizando la distribución de Poisson, es un método estadístico de distribución de probabilidad discreta, con la que se calculan las diferencias alélicas significativas entre muestras o especies cercanamente relacionadas. La última opción que da el GeneMarker es *Phylogeny Clustering Analysis* el cual incluye análisis filogenéticos, comparaciones de comunidades en ecología, patrón de expresión del gen, mapeo enzimático, clasificación de genes funcionales de la familia en campos bioinformáticos. Debido a que nuestro interés era conocer aquellas bandas comunes y no comunes a todas las muestras, para establecer diferencias en base a la presencia o ausencia de fragmentos o bandas, por lo que la opción *bin table* era la que se acoplaba a nuestras necesidades.

3. Seleccionamos el tipo de análisis a realizar en nuestro caso AFLP.



4. Se seleccionaron los siguientes parámetros que recomienda el software para este tipo de análisis.

- *Peak detection intensity Threshold: 100*

Se refiere al mínimo umbral RFU (Relative Fluorescence Units) de altura necesario para que se detecte un pico en el electroferograma. Los picos por debajo de este valor no se detectarán.

- *Global Percentage: 1 %*

Mínima intensidad relativa de los picos de los alelos con respecto al quinto pico más alto detectado por el color del tinte que detecta los picos.

- *Local Percentage: 1%*

Se utiliza el porcentaje del pico mas alto para ese marcador, para definir el umbral de detección del pico mínimo. Por ejemplo, si el umbral se fija en 33%, la altura de todos los picos de alelos debe alcanzar al menos el 33% de la altura del pico más alto en ese locus particular para que sea detectado.
- *Max Call Intensity: 30 000*

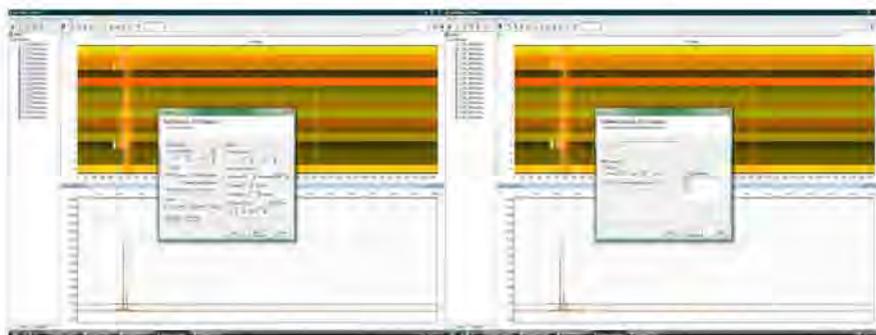
Es el máximo umbral RFU para determinar la altura de los picos. Los picos por encima de este valor no se detectaran.
- *Stutter Peak filter. Left 5% Right 5%*

Es un filtro que elimina el ruido que se encuentra a 2.5 pares de bases por delante y por detrás del pico principal, estos ruidos se producen comúnmente por las reacciones químicas y de PCR.
- *Plus A Filter: Selected*

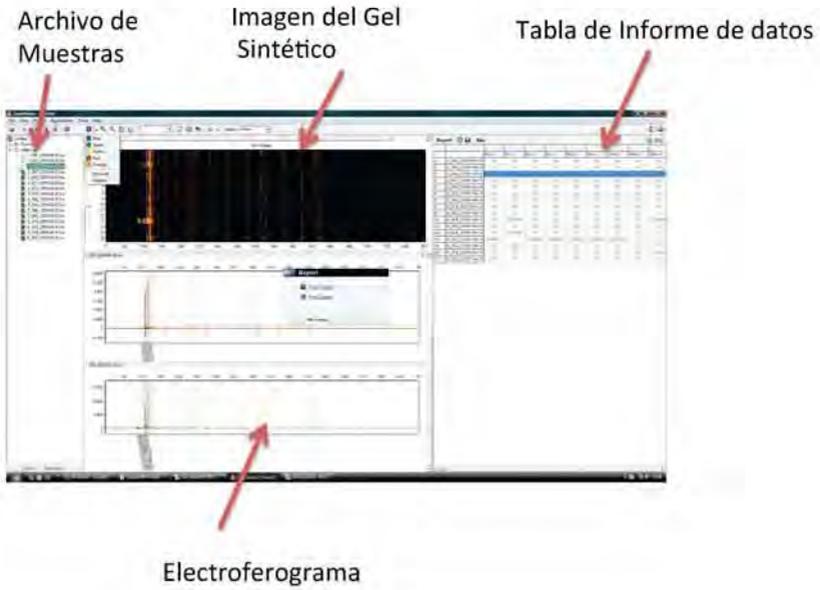
Cuando se selecciona, el segundo pico de un pico de split (un espacio de un solo par de bases entre dos picos) no será llamado. Anule la selección de llamar a los dos picos por separado.

- *Allele evaluation peak score*: Reject <1 check 7< Pass
El usuario puede definir un nivel de confianza de la llamada de alelos (Allele Call). Puntuación máxima es un algoritmo que toma en cuenta la señal ruido y la morfología de pico. Muestras rechazadas aparecen en rojo, las muestras que deben ser revisadas se muestran en amarillo, y las muestras que han pasado aparecen en color verde.
- *AFLP Unconfidence at Rightside Score*: <30
Sólo está disponible cuando el método de análisis AFLP se elija. Al seleccionar esta opción el usuario puede introducir la puntuación mínima en el que un pico puede localizado a la derecha del pico principal puede ser llamado o detectado.

Todas estos parámetros se introducen en la pantalla como se muestra en la siguiente figura:



5. Luego se genera el electroferograma.



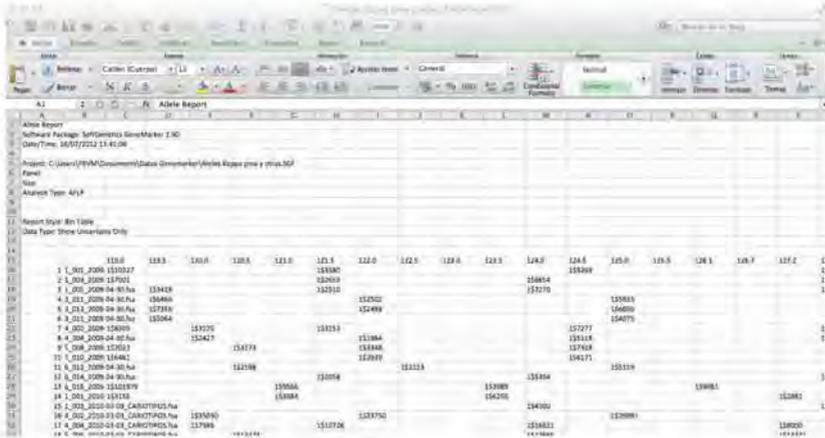
6. Se selecciona *Bin table* el cual exporta los datos en formato de Excel (.xls).

Guía de uso rápido de GenAlex

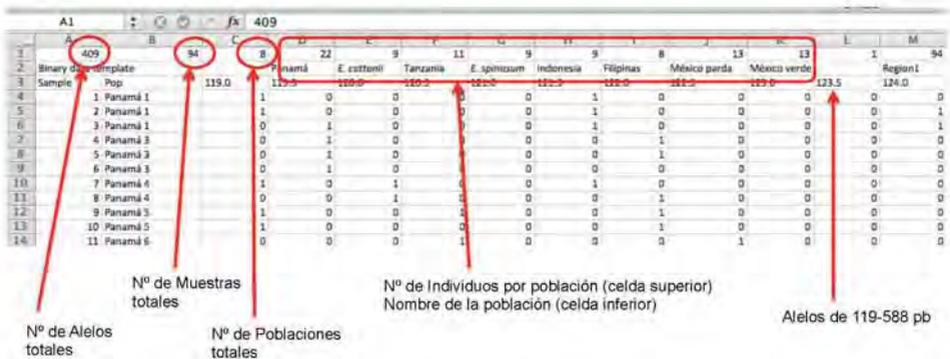
GENALEX, '*Genetic Analysis in Excel*', es un paquete de multi-plataforma para análisis de población genética que se ejecuta con Microsoft Excel. GenALEX utiliza los recursos que ofrece Excel, ofreciendo más de 20 gráficos diferentes para resumir los resultados de los análisis genéticos. GeneAlex permite el análisis de datos genéticos codominantes, haploides y binarios. Por lo tanto incluye toda la gama de marcadores genéticos disponibles desde aloenzimas, microsatélites, SNPs, AFLP y otros marcadores multilocus. Las herramientas de análisis son aplicables para plantas, animales y microorganismos. Para análisis basados en frecuencia de alelos incluye heterocigocidad, F estadístico, distancia genética de Nei, asignación de poblaciones, probabilidades de identidad y relaciones por pares. Cálculos basados en distancia como AMOVA, análisis de coordenadas principales (PCoA), Mantel tests, autocorrelación multivariada y espacial en 2D y Towgener. Este programa inicialmente fue desarrollado como una herramienta para la docencia, pero actualmente es muy útil para investigadores. (Peakall & Smouse 2006).

A continuación detallamos los pasos para la utilización de este software

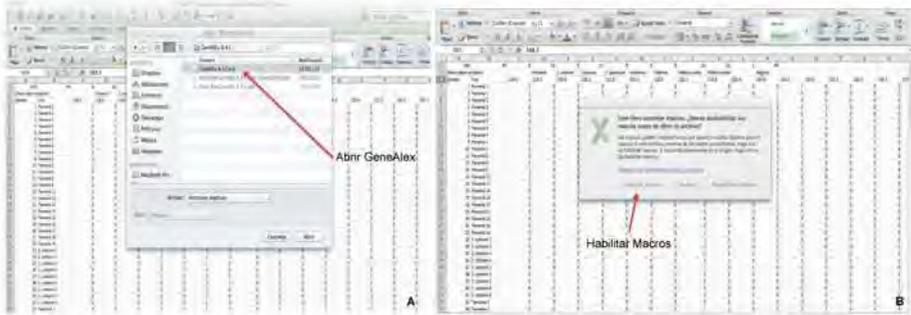
- Primero abrimos el formato de Excel generado por el GeneMarker.



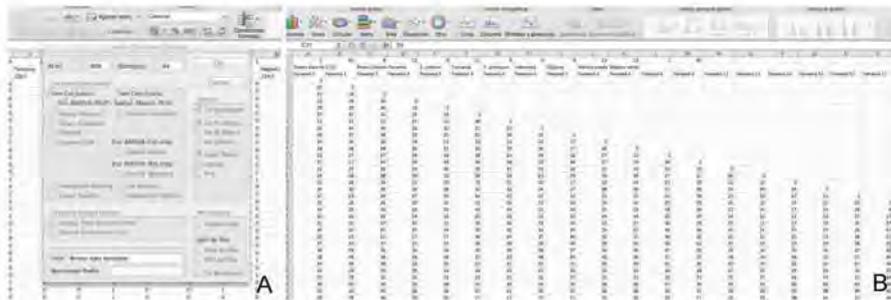
- Luego se procede a editar estos datos para que estén en formato binario (1- 0) y para que sean analizados por el GenAlex tienen que introducirse los datos de la siguiente manera como lo explica la figura.



- Una vez introducidos los datos de manera correcta para que el GenAlex los pueda leer, se procede a abrir el fichero de GenAlex (A) y luego le das la opción habilitar Macros (B).



- Luego seleccionamos de la barra del menú de herramientas, donde aparece GenAlex, con los diferentes tipos de análisis que realiza, en nuestro caso seleccionamos la opción distancia genética (A), ya que para realizar análisis de PCoA se necesita primero una matriz de distancia, como lo muestra la figura (B).



- Una vez establecida la matriz de distancia, seleccionamos del menú GenAlex, el análisis de coordenadas principales (PCoA), donde se genera el gráfico, como se observa en la siguiente figura.

