

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS CARRAGENANOS  
OBTENIDOS DEL ALGA ROJA, *Catenella impudica***

**CÉSAR FERNÁNDEZ MORANTES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2013**

**OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS CARRAGENAOS  
OBTENIDOS DEL ALGA ROJA, *Catenella impudica***

**CÉSAR FERNÁNDEZ MORANTES**

*Trabajo de grado en modalidad tesis, presentado como requisito parcial para optar por el  
título de química*

**DIRECTOR**

**RICARDO BENITEZ BENITEZ, Ph.D.**

**Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales**

**CODIRECTOR**

**LUIS ALBERTO LENIS, Ph.D.**

**Grupo de Investigación en Química de Productos Naturales**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**POPAYÁN**

**2013**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

Director\_\_\_\_\_

**Ph.D, RICARDO BENÍTEZ BENÍTEZ**

Jurado\_\_\_\_\_

**Ph.D, JAIME MARTIN FRANCO**

Jurado\_\_\_\_\_

**Ph.D, FABIO CABEZAS.**

**Popayán, 31 de Enero de 2013**

*A Dios gracias por todo, por darme una familia tan maravillosa que me apoya incondicionalmente, a mis maestros por brindarme esos conocimientos necesarios para comprender la vida; a mis amigos, fuera y dentro de la universidad, por sus gran compañía y amistad; a mi novia por estar a mi lado en estos momentos y a mi equipo de futsal que se convirtieron en mi otra familia, gracias por las innumerables vivencias y sueños compartidos, y a tí MADRE, solo a tí, te debo lo que realmente SOY.*

## CONTENIDO

	<b>pág.</b>
1. INTRODUCCIÓN .....	12
2. MARCO TEÓRICO.....	13
2.1 <i>Catenella impudica</i> .....	13
2.1.1. Taxonomía .....	13
2.2 CARRAGENANO.....	15
2.2.1. Nomenclatura y estructura .....	16
2.2.2. Propiedades .....	18
2.2.2.1. Gelificación.....	19
2.2.2.2. Viscosidad.....	20
2.2.2.3. Solubilidad .....	21
2.2.2.4. Actividad biológica .....	21
2.2.3. Fundamentos de la extracción.....	21
2.2.3.1. Tratamiento alcalino.....	22
2.2.3.2. Gel prensado.....	24
2.2.3.3. Precipitación por alcohol.....	24
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 GENERAL .....	25
3.2 ESPECÍFICOS .....	25
4. METODOLOGÍA .....	26
4.1 REACTIVOS Y EQUIPOS .....	26
4.2 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS .....	27
4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN .....	29
4.3.1. Variables .....	299

4.3.2. Análisis de datos .....	29
4.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	31
4.5 CARACTERIZACIÓN .....	34
4.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF) .....	34
4.5.2. Segunda derivada de IR-FT .....	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
5.1 PROCESO DE EXTRACCIÓN .....	35
5.1.1. Tratamiento alcalino en frío .....	35
5.1.2. Fraccionamiento del carragenano semirrefinado .....	36
5.1.3. Rendimientos de la extracción .....	37
5.2 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR-FT) .....	39
5.3 SUPERFICIE DE RESPUESTA .....	43
5.3.1. $\kappa$ /t-carragenano .....	43
5.3.2. $\theta$ -carragenano .....	49
6. CONCLUSIONES .....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	584
ANEXOS .....	640

## LISTA DE TABLAS

pág.

<b>Tabla 1.</b>	Factores independientes, niveles reales y codificados, que se emplearon para la optimización de las condiciones de extracción del carragenano.....	29
<b>Tabla 2.</b>	Diseño experimental incluyendo los niveles reales de las variables independientes ensayadas.....	30
<b>Tabla 3.</b>	Rendimientos de los carragenanos semirrefinado, refinados de acuerdo al diseño experimental presentado.....	37
<b>Tabla 4.</b>	Análisis de varianza para $\kappa/\iota$ -carragenano.....	42
<b>Tabla 5.</b>	Estimación de los resultados para la extracción de $\kappa/\iota$ -carragenano de la <i>Catenella impudica</i> .....	45
<b>Tabla 6.</b>	Optimización del proceso para $\kappa/\iota$ -carragenano .....	45
<b>Tabla 7.</b>	Análisis de varianza para $\theta$ -carragenano .....	47
<b>Tabla 8.</b>	Estimación de los resultados para la extracción de $\theta$ -carragenano de la <i>Catenella impudica</i> .....	51
<b>Tabla 9.</b>	Optimización del proceso para $\theta$ -carragenano .....	51
<b>Tabla A.1</b>	Datos y resultados para carragenano semirrefinado ( $\kappa/\iota$ - y $\theta$ ).....	61
<b>Tabla B.1</b>	ANOVA para carragenano semirrefinado con porcentaje de KOH. ....	62

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Catenella impudica</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Hábitos del crecimiento natural de <i>Catenella impudica</i> sobre las raíces de mangle en la costa pacífica colombiana .....	14
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de unidades repetitivas de tipos de carragenano, con nomenclatura de código de letras y prefijos griegos.....	17
<b>Figura 4.</b> Sustitución de grupos hidroxilos por sulfatos, teniendo las estructuras moleculares de las unidades repetitivas en $\lambda$ - y $\iota$ -carragenano . .....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura molecular de $\iota$ -carragenano y empaquetamiento de hélice en fibras orientadas de sales de cationes divalentes.....	19
<b>Figura 6.</b> Conversión de precursores biológicos en $\kappa$ - $\iota$ - y $\theta$ -carragenano mediante tratamiento alcalino o enzimático, formando el anillo 3,6-anhidro.....	23
<b>Figura 7.</b> Mapa de la Bahía de Buenaventura indicando las estaciones de muestreo .....	27
<b>Figura 8.</b> Proceso de semirrefinado de los carragenanos, formación de la unidad 3,6-AD, promoviendo la extracción y posterior fraccionamiento del polisacárido. ....	31
<b>Figura 9.</b> Proceso de extracción y fraccionamiento de los carragenanos .....	32
<b>Figura 10.</b> Algas lavadas con agua destilada, previas a secado.....	34
<b>Figura 11.</b> Producto del tratamiento alcalino en frío .....	35
<b>Figura 12.</b> Productos obtenidos a partir de la <i>Catenella impudica</i> , después de su secado entre 42-45 °C. ....	35
<b>Figura 13.</b> Espectro infrarrojo del carragenano insoluble de la <i>Catenella impudica</i> .....	38
<b>Figura 14.</b> Espectro infrarrojo del carragenano soluble de la <i>Catenella impudica</i> . ....	39
<b>Figura 15.</b> Segunda derivada del espectro infrarrojo del carragenano insoluble de la <i>Catenella impudica</i> , entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ .....	40

<b>Figura 16.</b> Segunda derivada del espectro infrarrojo del carragenano soluble de la <i>Catenella impudica</i> , entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ .....	40
<b>Figura 17.</b> Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de $\kappa$ /I-carragenano de la <i>Catenella impudica</i> .....	43
<b>Figura 18.</b> Gráfica de los efectos principales para $\kappa$ /I-carragenano.....	44
<b>Figura 19.</b> Superficie de respuesta para $\kappa$ /I-carragenano.....	46
<b>Figura 20.</b> Diagrama de Pareto estandarizado de para la extracción de $\theta$ -carragenano de la <i>Catenella impudica</i> .....	48
<b>Figura 21.</b> Gráfica de los efectos principales para $\theta$ -carragenano.....	49
<b>Figura 22.</b> Efecto de la interacción de factores para $\theta$ -carragenano .....	50
<b>Figura 23.</b> Superficie de respuesta para $\theta$ -carragenano .....	52
<b>Figura 24.</b> Segunda derivada entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ , del espectro infrarrojo de $\theta$ -carragenano de la <i>Catenella impudica</i> .....	51
<b>Figura C.1</b> Espectros infrarrojos de $\kappa$ /I-carragenano, para las 18 pruebas realizadas.....	63
<b>Figura C.2</b> Derivada segunda de la región comprendida entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de $\kappa$ /I-carragenano .....	64
<b>Figura C.3</b> Espectros infrarrojos de $\theta$ -carragenano, para las 18 pruebas realizadas.....	67
<b>Figura C.4</b> Derivada segunda de la región comprendida entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ de los espectros de $\theta$ -carragenano.....	68

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
<b>Anexo A.</b> Datos y resultados para el carragenano semirrefinado, $\kappa/\iota$ - y $\theta$ -carragenano según diseño experimental.....	61
<b>Anexo B.</b> Contraste de significancia para carragenano semirrefinado por porcentaje de KOH.....	62
<b>Anexo C.</b> Caracterización del carragenano por espectroscopía infrarroja y segunda derivada .....	63
<b>Anexo D.</b> Certificado de participación en el 43 <sup>rd</sup> IUPAC World Chemistry Congress en calidad de poster .....	71

## RESUMEN

Las algas rojas o de la familia de las *Rhodophyceae*, son de gran importancia mundial debido a que estas biosintetizan un tipo de polisacárido, denominado carragenano, de amplio uso en el sector alimenticio. En Colombia, específicamente en la Costa Pacífica, se encuentra muy difundida una especie de este tipo de alga, la *Catenella impudica*, de la cual no se conocen reportes de estudios sobre los tipos de carragenanos que biosintetiza y por lo tanto, de sus propiedades.

En este proyecto se optimizó la extracción de los carragenanos de la *Catenella impudica*, realizándole a las muestras de alga un tratamiento alcalino en frío, seguido de la solubilización. La separación de los tipos de carragenanos se llevó a cabo de acuerdo a sus diferencias de solubilidad a temperatura ambiente. Se identificaron dos tipos de carragenano, el híbrido  $\kappa/\iota$ -carragenano y el  $\theta$ -carragenano; por medio de la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF), y el empleo de la segunda derivada de los mismos espectros. Se hallaron valores óptimos de concentración y volumen de solución alcalina, temperatura y tiempo para  $\kappa/\iota$ -carragenano de 2.74 %, 368.2 mL, 93,0 °C y 40.0 min. y para  $\theta$ -carragenano de 3.4 %, 31.8 mL, 76.6 °C y 140.0 min., respectivamente.

Los resultados del presente trabajo fueron presentados en el 43<sup>er</sup> Congreso Mundial de Química, en la ciudad de San Juan, Puerto Rico; entre el 31 de Julio y el 3 de Agosto de 2011 (Anexo D).

*Palabras Claves:* Carragenano, *Catenella impudica*, alga roja, optimización de extracción, infrarrojo (IR-FT), segunda derivada.

## 1. INTRODUCCIÓN

El carragenano es un nombre genérico para denominar a un tipo de polisacárido de origen natural, encontrado y extraído de las paredes celulares de cierto tipo de especies de algas rojas (Rhodophyta): *Gigartina stellata*, *Euchema spinosum*, *E. cottonii*, entre otras; en Europa, Asia y América. Este tipo de polisacárido es empleado principalmente en la industria alimenticia como espesante, estabilizante o gelificante de sistemas acuosos, destacándose su empleo en la elaboración de postres lácteos, helados, flanes, yogurt, y otros productos. Este tipo de industria recurre entre 70-80% de la producción total mundial, teniéndose que el mercado del carragenano mueve aproximadamente unos US \$300 millones anuales. Además, es utilizado en productos no alimenticios como los farmacéuticos, cosméticos o formulaciones textiles.

Se tiene un amplio conocimiento de las propiedades química, físicas y biológicas del carragenano, pero poco se conoce del que es biosintetizado por la *Catenella impudica*, la cual es una especie de alga roja que se difunde ampliamente a lo largo de la costa pacífica colombiana en ambientes de manglar, creciendo sobre las raíces de *Rhizophora*, encontrándose en zonas intermareales, a menos de 5 metros de profundidad.

La *Catenella impudica* pertenece a estas especies productoras de carragenano, constituyéndose en una excelente candidata para investigar la optimización de la extracción de los tipos de carragenano que biosintetiza, promoviéndose la investigación de esta macroalga, dando una alternativa de explotación sostenible para la comunidad del Pacífico colombiano debido al gran interés del mercado mundial por este compuesto

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Catenella impudica*

La *Catenella impudica* es una especie de alga roja (*Rhodophyta*), el cual es el filo mas diverso y abundante en el agua de mar, diferenciándose de los otros tipos de algas por no tener ningún tipo de flagelo y presentar un pigmento fotosintético que le da el color natural a las algas rojas, llamado ficobilina (ficoeritrina y ficocianina). Además, posee otros pigmentos como los carotenos y xantófilas.<sup>1</sup>

Esta especie se encuentra asociada a ecosistemas de manglares, en zonas intermareales, soportando baja salinidades y desarrollándose a temperaturas de alrededor de los 27 °C. Su ciclo de vida fundamentalmente consta de tres fases, una gametofítica o sexual, teniendo dos plantas una masculina y una femenina o una planta con los dos gametos. Otra fase es la carposporofítica, donde el gameto femenino fecundado muestra un proceso de postfertilización generando una unidad llamada cistocarpio; y la última fase es la tetrasporofítica o fase asexual libre, que sucede después de la germinación originando nuevamente el ciclo al producirse nuevamente los gametos.<sup>2</sup>

Esta macroalga podría poseer un gran valor comercial, ya que podría emplearse para producir una variedad de ficocoloides conocidos como carragenanos, los cuales son utilizados en varias industrias, principalmente la alimenticia.<sup>2</sup>

#### 2.1.1. Taxonomía

Esta especie posee talos de color púrpura, violáceos hasta pardos formando segmentos afilados, poco comprimidos, carnosos, no blandamente gelatinosos de 2 a 10 mm de largo y de 1 a 2.5 mm de ancho, creciendo en forma de césped entre 3 a 4 cm de altura. Los segmentos jóvenes son delgados, y los viejos son anchos y aplanados.<sup>2</sup>

Su clasificación taxonómica es:<sup>3</sup>

**Dominio:** *Eukaryota*

**Reino:** *Plantae*

**Subreino:** *Biliphyta*

**Filo:** *Rhodophyta*

**Subfilo:** *Eurhodophytina*

**Clase:** *Florideophyceae*

**Subclase:** *Rhodymeniophycidae*

**Orden:** *Gigartinales*

**Familia:** *Caulacanthaceae*

**Genero:** *Catenella*

**Especie:** *impudica*



**Figura 1.** *Catenella impudica*<sup>4</sup>

### 2.1.2. Hábitos ecológicos

Su distribución es amplia a lo largo de la Costa Pacífica colombiana en áreas costeras y propias en ambientes de manglar creciendo sobre las raíces de *Rhizophora* (manglar rojo) (Figura 2). Se encuentra en la zona intermareal, y a profundidades someras menores a 5 metros. De naturaleza perenne, con cobertura y germinación durante todo el año. Dominante sobre la raíz, troncos y objetos duros presentes en el mangle, formando densos tapetes junto con algas rojas del complejo *Bostrychetum*, compuesto principalmente por géneros *Bostrychia* y *Caloglossa*.<sup>5</sup>



**Figura 2.** Hábitos del crecimiento natural

de *Catenella impudica* sobre raíces de mangle en la costa pacífica colombiana. (©2002. Enrique J. Peña)<sup>1</sup>

### 2.1.3. Distribución en Colombia<sup>5</sup>

- **Caribe Colombiano**

- ✓ **Departamento del Magdalena:** Ciénaga Grande de Santa Marta, sobre raíces de mangle.
- ✓ **Departamento de Córdoba:** Bahía de Cispata, sobre zona infralitoral, a 0,80m.

- **Pacífico Colombiano**

- ✓ **Departamento del Choco:** Bahía Cupica, sobre rocas en zona intermareal, encima de la línea de reflujo. Bahía Solano, sobre raíces de mangle, en la zona intermareal.
- ✓ **Departamento del Valle:** Bahía de Buenaventura, sobre la desembocadura del Río Dagua, en la zona intermareal, abundante sobre raíces de mangle.
- ✓ **Departamento de Nariño:** Isla del gallo, en zona intermareal, sobre raíces de mangle.

## 2.2 CARRAGENANO

El término carragenano es un nombre genérico para denominar a un tipo de polisacáridos que son extraídos de cierto tipo de especies de algas rojas (*Rhodophyta*): *Gigartina*, *Chondrus crispus*, *Eucheumae Hypnea*<sup>6</sup>, siendo los principales componentes que ayudan en la construcción de la pared celular, mediando en el reconocimiento célula-célula en las interacciones huésped-patógeno. Debido a sus propiedades físico-químicas son

abundantemente utilizados como agentes de espesamiento y gelificación<sup>7</sup>, especialmente en la industria alimenticia para la preparación de ciertos productos lácteos y cárnicos.<sup>6</sup>

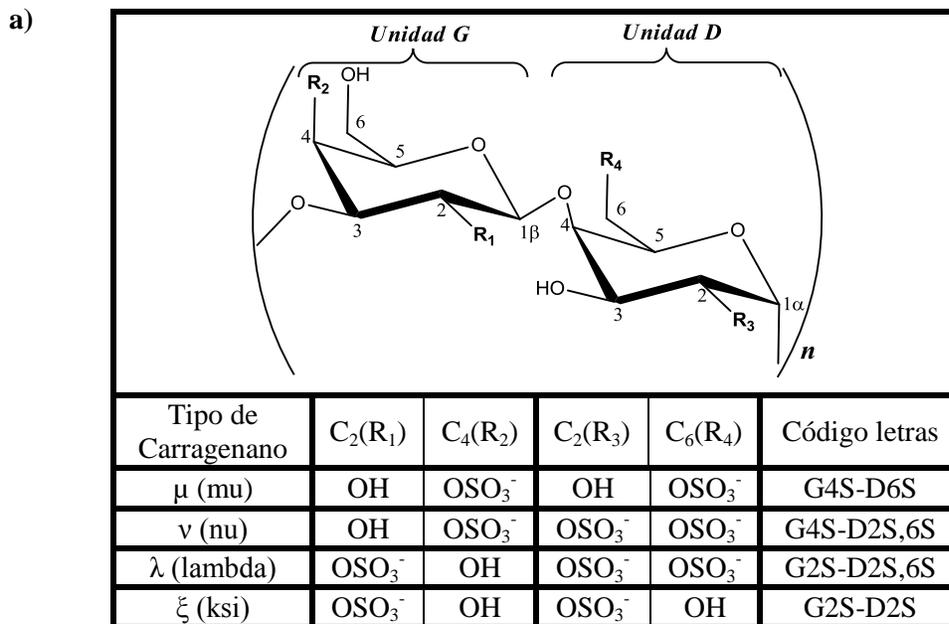
### **2.2.1. Nomenclatura y estructura**

Los carragenanos son mezclas de galactanos solubles, lineales y sulfatados. Compuestos de unidades alternadas de  $\beta$ -D-galactopironosa, y  $\alpha$ -D-galactopironosa o 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactosapironosa, designadas como unidades G, D y AD, respectivamente, unidas mediante enlaces glicósidos  $\alpha$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,4). Teniéndose así, la unidad de disacárido a repetir en este compuesto.<sup>8</sup> Varios hidroxilos presentes, pueden estar sustituidos por sulfatos, piruvatos o metilos.<sup>9,10</sup>

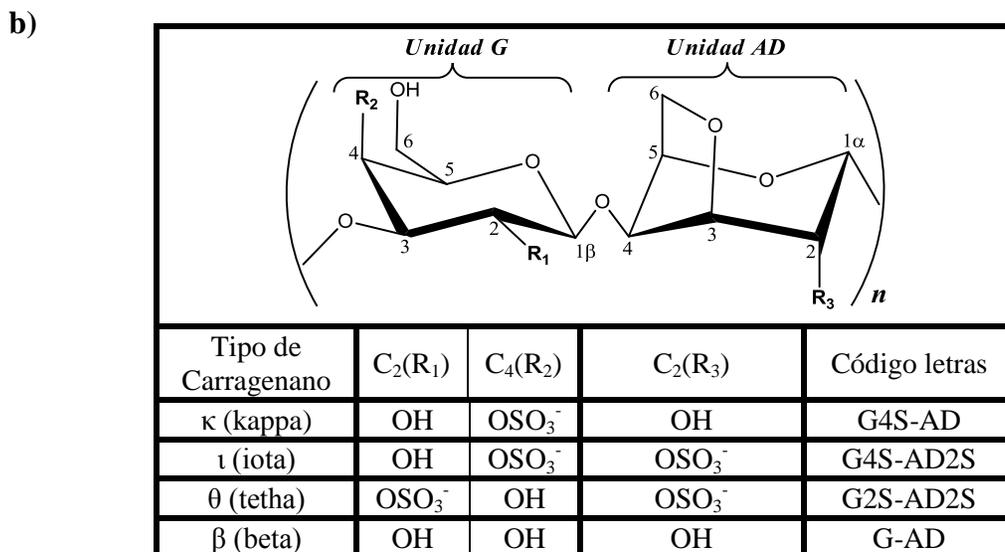
Los galactanos sulfatados son clasificados mediante códigos de letras, de acuerdo a la posición y número de grupos sulfatos, sobre cada unidad presente. Además, para los tipos más comunes de carragenano se cuenta con un tipo de identificación con prefijos de letras griegas, siendo comercialmente más importantes tres tipos:  $\kappa$  (kappa),  $\iota$  (iota) y  $\lambda$  (lambda)-carragenano.<sup>8</sup> (Figura 3)

Aunque se encuentran otros tipos como el  $\mu$ -(mu) y el  $\nu$ -(nu) carragenano, que se obtienen de muestras de carragenano por métodos de extracción suaves, siendo precursores biológicos de  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano, respectivamente.<sup>11</sup>

## UNIDADES BÁSICAS DE DISACARIDO DEL CARRAGENANO



*Unidad G*, β-D-Galactopiranososa. *Unidad D*, α-D-Galactopiranososa



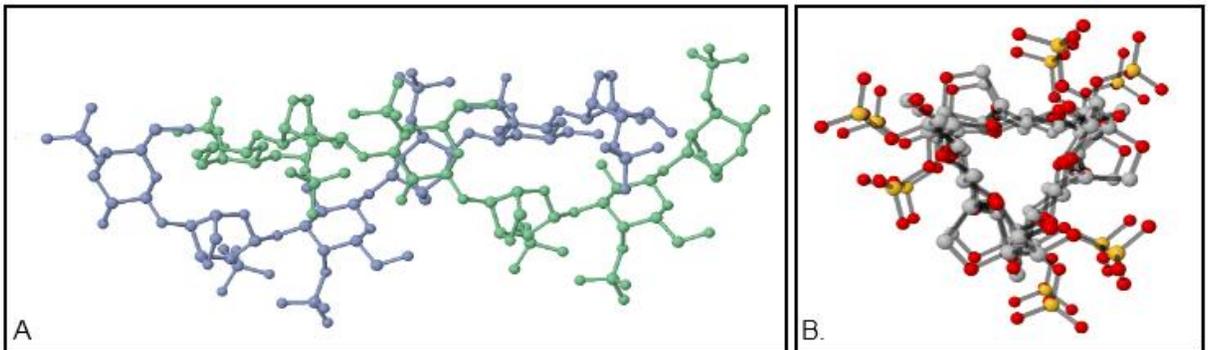
*Unidad G*, β-D-Galactopiranososa. *Unidad AD*, 3,6-anhidro-α-D-Galactopiranososa

**Figura 3.** Representación esquemática de las unidades repetitivas de los diferentes tipos de carragenano, con nomenclatura de código de letras y prefijos griegos. **a)** Hidroxilos sustituidos por sulfatos, en posiciones 4 y 2 de la unidad G (β-D-galactopiranososa) , y en posiciones 2 y 6 de la unidad D (α-D-galactopiranososa). **b)**



### 2.2.2.1. Gelificación

Los geles formados por los carragenanos llegan a ser termorreversibles cuando se trabajan bajo las condiciones de solvente y ciclos de calentamiento y enfriamiento apropiados, donde se presentan varios cambios estereoquímicos en la molécula. Los  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano son capaces de formar geles, donde después de su dispersión, hidratación y solubilización de la molécula, al aumentar la temperatura; se presentan como cadenas simples y aleatorias, que al someterse posteriormente a un proceso de enfriamiento, adquieren una conformación ordenada de doble hélice, siendo esta estructura energéticamente la más estable (Figura 5), las cuales interaccionan entre sí y forman una red tridimensional que generan un gel estable y firme.<sup>12</sup> Todo este proceso se puede ver también en dos sucesivos y distintos pasos; una transición de cola a hélice en el enfriamiento y la posterior agregación, dependiente de los cationes que se encuentren entre las cadenas. La presencia de un catión adecuado es un requisito esencial para la gelificación, siendo los iones metálicos alcalinos capaces de inducir dicho proceso.<sup>10</sup>



**Figura 5.** Estructura molecular de  $\iota$ -carragenano y empaquetamiento de doble hélice en fibras orientadas de sales de cationes divalentes. A) Vista lateral de la doble hélice, diferenciándose las dos cadenas de carragenano. B) Vista frontal de la doble hélice.<sup>14</sup>

Entre los iones más utilizados se encuentra los iones potasio ( $K^+$ ), que son capaces de introducirse entre las dobles hélices, neutralizando las cargas de los grupos sulfatos que se encuentran orientados hacia el exterior de la hebra (Figura 5B), lo cual facilita el acercamiento entre ellas y por tanto una mayor estabilización de toda la estructura.<sup>10</sup>

#### **2.2.2.2. Viscosidad**

Este tipo de compuesto puede generar soluciones de alta viscosidad debido a su estructura macromolecular lineal y a su naturaleza polieléctrica, debido a que se tienen grupos sulfatos a lo largo de la cadena, se presentan repulsiones llevando a que la molécula permanezca expandida. Además, su carácter hidrofílico hace que permanezca rodeada de agua; generando una resistencia al fluido de comportamiento no newtoniano del tipo pseudoplástico, cuando la viscosidad es alta.<sup>12</sup>

La viscosidad de este tipo de compuesto, está relacionado con el tipo de carragenano, peso molecular, concentración y otros solutos presentes en solución. Siendo así, al aumentar la concentración del polisacárido, la viscosidad aumenta exponencialmente, comportamiento característico de los polielectrolitos. El aumento de la viscosidad puede ocurrir por dos diferentes mecanismos:<sup>10</sup>

- Incremento de la interacción entre las cadenas lineales, debido al aumento de la concentración del carragenano. La presencia de sales en la solución, hace que disminuya la viscosidad al reducir las repulsiones electrostáticas entre los grupos sulfato. Esto ocurre para  $\lambda$ -carragenano.
- Formación de gel, causado por entrecruzamiento de las cadenas al presentarse bajas concentraciones de sales y de temperatura, llevando a la solución a un incremento aparente de la viscosidad. Ocurriendo para  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano.

Además, la temperatura es inversa a la viscosidad, de una forma reversible; cuando esta aumenta, se obtiene soluciones de carragenano de baja viscosidad y a medida que su temperatura baja, la viscosidad por tanto, aumenta.<sup>12</sup>

### **2.2.2.3. Solubilidad**

Este proceso conlleva a la hidratación de las moléculas de carragenano en función de la concentración, tipo de cationes presentes, temperatura del agua y medio de dispersión.<sup>12</sup>

Todas las fracciones de carragenanos son solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos, aceites o grasas; pero la solubilidad en agua depende del grado sulfatación y en sus cationes como sodio, potasio, calcio y magnesio.<sup>10</sup>

Cuando se presenta un alto grado de sulfatación, habrá una mayor repulsión entre las cadenas, encontrándose más apartadas. Por tanto,  $\lambda$ -carragenano es soluble en agua tanto en caliente como en frío. Caso opuesto, para  $\kappa$ -carragenano que necesita un calentamiento para alcanzar la solubilización de sus cadenas debido a su bajo contenido de sulfatos.<sup>12</sup>

### **2.2.2.4. Actividad biológica**

Este tipo de compuesto posee propiedades biológicas importantes, reportándose diferentes investigaciones, en donde sobresale la actividad antiviral, específicamente contra el virus de herpes simple<sup>15</sup>, actuando como inhibidor selectivo en determinados tipos de células como Vero (células renales de mono: *Cercopithecus aethiops*), además en células humanas, encontrándose que entre los diferentes tipos de carragenano el  $\lambda$ -carragenano tiene un índice mayor de selectividad y un modo de acción dual, al inactivar y bloquear la adsorción del virus.<sup>16</sup> En otras investigaciones se reportan los efectos variables sobre el sistema inmune y una baja actividad anticoagulante.<sup>17, 18</sup>

### **2.2.3. Fundamentos de la extracción**

Los fundamentos para la extracción del carragenano, están basados principalmente en la solubilidad en agua e insolubilidad en solventes orgánicos polares, igualmente de sus otras propiedades.<sup>19</sup>

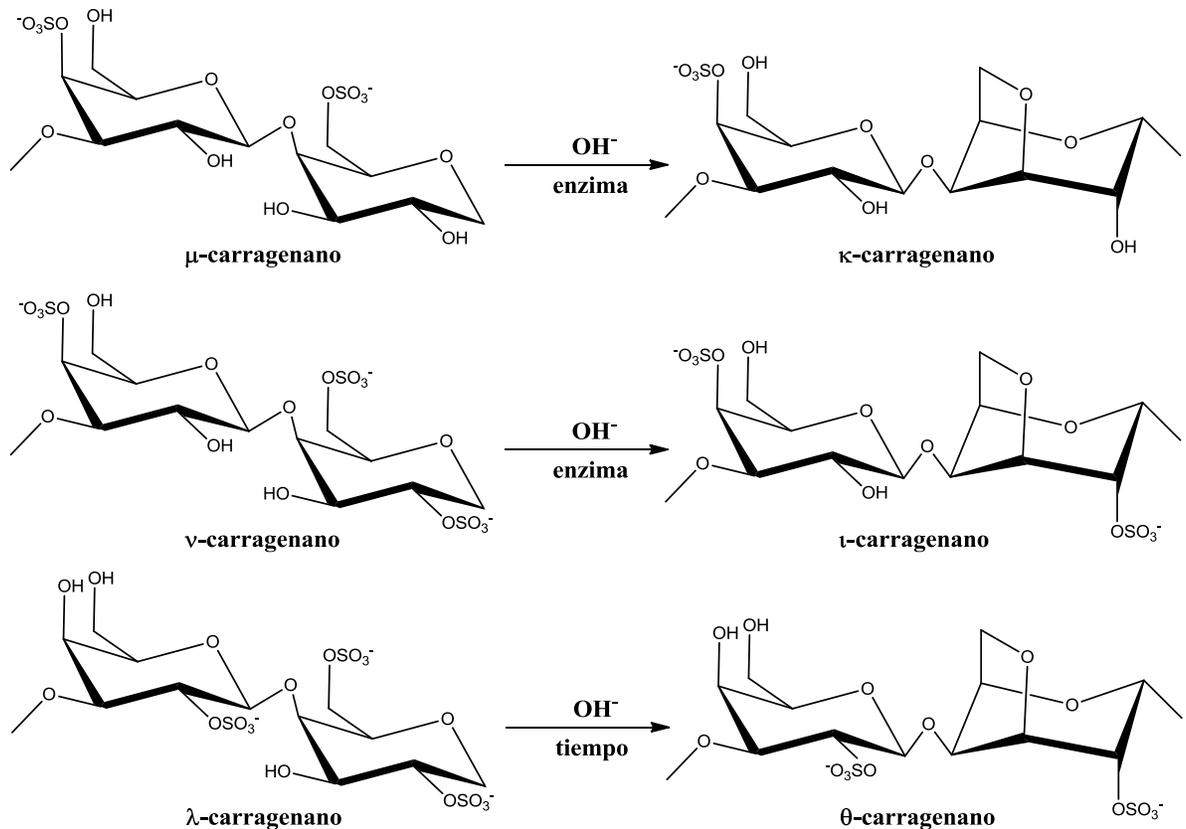
Aparte de realizar tratamientos previos de limpieza para retirar materias extrañas, y de molienda grosera; se llevan a cabo tres procesos elementales sucesivos, un tratamiento alcalino y otros dos de refinado, siendo estos últimos de gel prensado y de precipitación por alcohol, diferenciándose estos últimos en la forma de precipitación y del tipo obtenido de carragenano.<sup>12</sup>

#### **2.2.3.1. Tratamiento alcalino**

El tratamiento alcalino es básicamente la conversión de precursores biológicos, como  $\mu$ - y  $\nu$ -carragenano en  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano, respectivamente. Y  $\lambda$ -carragenano en  $\theta$ -carragenano (Figura 6). Aprovechándose así, las propiedades gelificantes con que estos cuentan.<sup>11</sup> Esta conversión en sí es la formación de unidades 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactopiranosas (AD) a partir de unidades 6-sulfato- $\alpha$ -D-galactopiranosas (D6S), donde se produce una desulfatación solvolítica.<sup>20</sup>

El mecanismo de esta reacción está basado en dos pasos consecutivos. En el primero, las unidades 6-sulfato- $\alpha$ -D-galactopiranosas (D6S) cambian la conformación  ${}^4C_1$  (ecuatorial 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>-galactopiranosas), a la conformación  ${}^1C_4$  por el incremento de la temperatura; colocando a 6-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup> y C3-OH de la posición ecuatorial (e,e), a la axial (a,a). La fuerza del álcali presente, simultáneamente ioniza los grupos hidroxilos libres (C2 y C3 en  $\mu$ -carragenano y C3 en  $\nu$ -carragenano), de la unidad  $\alpha$ -D-galactopiranosas, produciendo aniones alcoxi en dichas posiciones. En el segundo paso se presenta un desplazamiento nucleofílico del C6-sulfato por la acción del anión alcoxi en C3, formándose el puente 3,6-anhidro; generándose la unidad anhidrogalactopiranosas (DA), lo que libera al grupo sulfato.

En  $\mu$ -carragenano solo el anión alcoxi en C3, tiene una estereoquímica favorable (axial), siendo esta la única posibilidad de ataque intramolecular.<sup>21, 22</sup>



**Figura 6.** Conversión de precursores biológicos en  $\kappa$ -  $\iota$ - y  $\theta$ -carragenano mediante tratamiento alcalino o enzimático, formando el anillo 3,6-anhidro.<sup>21, 23</sup>

Esta reacción de ciclación llega a ser entre 20 a 60 veces más rápido a partir de  $\mu$ - y  $\nu$ -carragenano que de  $\lambda$ -carragenano.<sup>23, 24</sup> La presencia de grupos ester sulfato contiguos al hidroxilo del C3 de la unidad  $\alpha$ -galactopiranososa, impide el ataque intramolecular, disminuyendo la velocidad de reacción, explicándose la falta de derivados ciclados de  $\lambda$ -carragenano en la naturaleza.<sup>24</sup>

### **2.2.3.2. Gel prensado**

Esta forma de refinamiento del carragenano se realiza por medio de precipitación con KCl, cuando el polisacárido se encuentra en solución. La precipitación se presenta debido a las interacciones iónicas que hay entre la sal y el carragenano, originando la desestabilización de la molécula. El gel formado se prensa para remover el agua presente antes del secado, lo que le da el nombre característico a este método. Los tipos de carragenano precipitados por este procedimiento, son los que son fuertemente sensibles a los iones potasio como son el  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano.<sup>12</sup>

### **2.2.3.3. Precipitación por alcohol**

Este método es el más utilizado desde tiempos antiguos. Realizado generalmente con alcohol isopropílico, para deshidratar y coagular la molécula. La precipitación que se realiza por este método no es selectiva, lo que hace que no sea eficiente para la separación de los tipos de carragenano presentes en solución.<sup>12</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

- Optimizar la extracción de carragenanosG del alga roja, *Catenella impúdica*; mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (RSM).

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar la influencia de la concentración y el volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo, en la extracción del carragenano.
- Analizar estadísticamente el contenido de carragenano, considerando las variables concentración y el volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo.
- Identificar los carragenanos estudiados por espectroscopia infrarroja (IR-TF), y la aplicación de la segunda derivada, verificando las bandas con la literatura.
- Evidenciar por espectroscopía infrarroja, la posible presencia de trazas de otros tipos de carragenano en las muestras refinadas.

## **4. METODOLOGÍA**

La metodología, equipos y reactivos de alta pureza y los solventes de grado analítico utilizados en la extracción del carragenano refinado, y la técnica instrumental de caracterización, se describe a continuación.

### **4.1 REACTIVOS Y EQUIPOS**

#### **4.1.1. Reactivos**

Acetona (Fisher Scientific 99.7%)

Isopropanol (Merck A.C.S 98%)

Hidróxido de Potasio (Merck A.C.S 85%)

Cloruro de Potasio (Merck A.C.S 100%)

Bromuro de Potasio (Merck A.C.S)

#### **4.1.2. Equipos**

Balanza analítica Precisa XT220A

Campana de extracción C4, modelo C180X

Plancha de calentamiento y agitación Corning, modelo PC 420

Baño María 1Dies, modelo D5000

Destilador Schott Gerate

Estufa Fisher Scientific, modelo 737G

pH-metro Fisher Scientific Accumet AB15

Infrarrojo con Transformada de Fourier, Thermo modelo IR200

## **4.2 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS**

La *Catenella impudica* utilizada como fuente para la extracción del carragenano se recibió en el grupo de investigación Química de Productos Naturales, proveniente del departamento de biología de la Universidad del Valle. Previo a su uso, la muestra se mantuvo en bolsas plásticas, selladas y almacenadas en desecador a temperatura ambiente.

### **4.2.1. Sitio de muestreo<sup>2</sup>**

Las muestras del alga fueron colectadas en dos estaciones de muestreo: Desembocadura del río Dagua e Isla Cangrejo, en el costado suroriental de la Bahía de Buenaventura, estuario tropical de un área aproximada de 70 km<sup>2</sup> (Figura 7). Presenta un clima cálido superhúmedo, caracterizada por su alta precipitación, con humedad relativa de 88%, casi constante a lo largo del año, y temperatura promedio del agua de 27,8 °C. Las formaciones vegetales predominantes en la línea de la costa son los bosques de manglar cuyas raíces albergan una vegetación característica de macroalgas bénticas.



**Figura 7.** Mapa de la Bahía de Buenaventura indicando las estaciones de muestreo. 1) Estación - Desembocadura del río Dagua. 2) Estación - Isla Cangrejo.<sup>2</sup>

#### **4.2.2. Recolección de las muestras<sup>2</sup>**

El alga roja se colectó de forma manual durante marea baja, desprendiéndola cuidadosamente de los sustratos en los que comúnmente crece (raíces de mangle); para ello se colocó aleatoriamente una cuadrícula de 50 x 50 cm en diez de esos árboles, habiendo trazado previamente un transecto de 50 m.

Las muestras fueron lavadas y colocadas en toallas de papel humedecidas con agua marina, se empacaron en bolsas sellables de polietileno, y mantenidas en una nevera de icopor con hielo hasta su traslado al laboratorio de la sección de botánica del departamento de biología de la Universidad del Valle. Su clasificación se llevo a cabo por los Doctores Philip A. Silverstone Sopkin y Enrique J. Peña, de acuerdo con los ejemplares presentes en la colección de referencia de herbario CUVC de la Universidad del Valle, bajo el número 46406. Posteriormente, las muestras se limpiaron de materia extraña y prontamente se secaron a una temperatura aproximada de 60 °C.

### **4.3 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN**

Las mejores condiciones de extracción de carragenano, se determinaron mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta (RSM) con un diseño factorial completamente al azar (CRFD), generado mediante el uso de 4 factores, 3 niveles, 1 bloque. Utilizando el software STATGRAPHICS® Centurion XV (©Statpoint Inc. 1982-2007, USA, versión 15.2.06).<sup>25</sup> En las tablas 1 y 2 se presentan los diferentes factores y los niveles en los que fueron empleados.

#### **4.3.1. Variables**

Se tuvieron en cuenta cuatro factores (Concentración y volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo), manejándose a tres niveles equidistantes (-1, 0 y +1). Las condiciones y demás características de la extracción, como la cantidad de alga, la temperatura de secado, y el volumen de isopropanol; se mantuvieron constantes. La variable de respuesta ( $Y_0$ ), fueron la cantidad de  $\kappa$ - y  $\theta$ -carragenano obtenidos, los cuales se analizaron por separado.

#### **4.3.2. Análisis de datos**

Los datos obtenidos de la metodología de superficie de respuesta (RSM), de las condiciones óptimas y de la influencia de las variables (Concentración y volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo), en la cantidad de carragenano presente en la muestra; se

determinó empleando el software STATGRAPHICS® Centurion XV.<sup>25</sup> El análisis de multivariantes y de superficie de respuestas, con la interpretación cruzada de los resultados de los mismos, indicaron la influencia de las variables.

**Tabla 1.** Factores independientes, niveles reales y codificados, que se emplearon para la optimización de las condiciones de extracción del carragenano.

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Temperatura (A) (°C)	80	85	90
Concentración KOH (B) (%)	4	6	8
Vol. Solución KOH (C) (mL)	100	200	300
Tiempo (D) (min)	60	90	120

**Tabla 2.** Diseño experimental incluyendo los niveles reales de las variables independientes ensayadas.<sup>25</sup>

Prueba	A	B	C	D	Y <sub>0</sub>
1	90,0	8,0	300,0	60,0	
2	80,0	8,0	100,0	120,0	
3	85,0	9,4	200,0	90,0	
4	85,0	6,0	31,8	90,0	
5	85,0	6,0	368,2	90,0	
6	93,4	6,0	200,0	90,0	
7	90,0	8,0	100,0	120,0	
8	85,0	2,7	200,0	90,0	
9	80,0	4,0	300,0	120,0	
10	85,0	6,0	200,0	140,0	
11	80,0	8,0	300,0	60,0	
12	90,0	4,0	100,0	60,0	
13	85,0	6,0	200,0	90,0	
14	80,0	4,0	100,0	60,0	

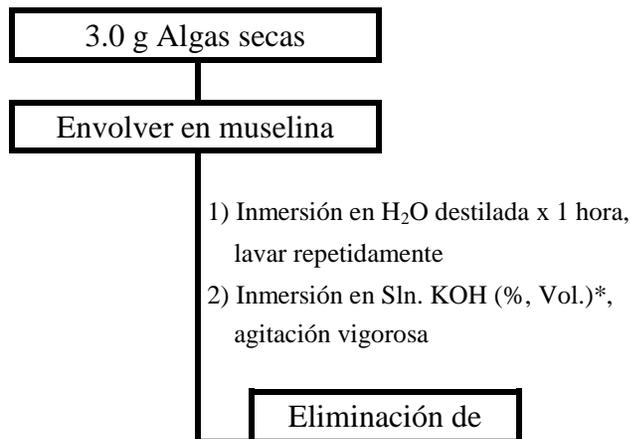
15	90,0	4,0	300,0	120,0
16	85,0	6,0	200,0	90,0
17	85,0	6,0	200,0	40,0
18	76,6	6,0	200,0	90,0

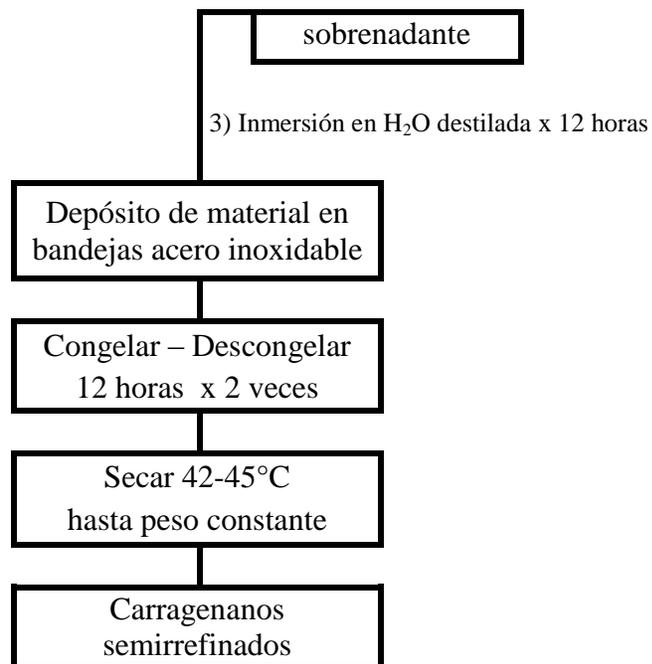
A: Temperatura (°C); B: Concentración Sln. KOH (%); C: Volumen Sln. KOH (mL); D: Tiempo (min.); Y<sub>0</sub>: Cantidad de carragenano (%).

#### 4.4 PROCESO DE EXTRACCIÓN

Para la extracción del carragenano de la *Catenella impudica*, se utilizó la metodología expuesta por Salas<sup>19</sup>, con modificaciones. El alga seca se sometió a un proceso de limpieza, mediante el lavado sucesivo con agua. Seguido, el alga preparada se le aplicó un tratamiento alcalino, con agitación vigorosa; lo que promovió la formación de la unidad 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactopiranosas, la extracción y su separación a través de disolución, obteniéndolo de forma semirrefinada (Figura 8). Posteriormente, se llevó a baño maría, dejando los carragenanos en solución, y de acuerdo a diferencias de solubilidad, con respecto a la temperatura; se fraccionan en los tipos de carragenano (Figura 9).

#### TRATAMIENTO ALCALINO EN FRIO

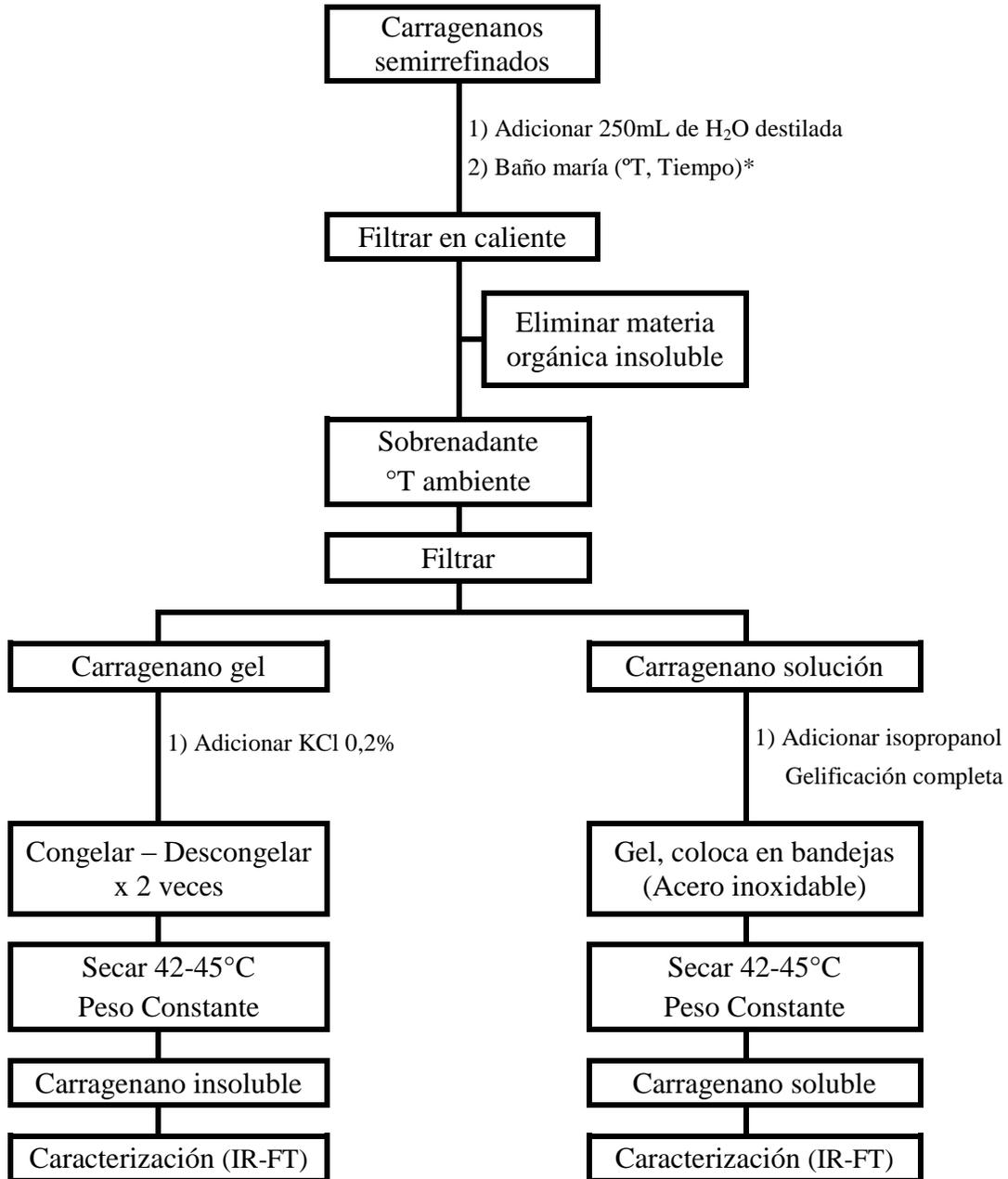




**Figura 8.** Proceso de semirrefinado de los carragenanos, formación de la unidad 3,6-AD, promoviendo la extracción y el posterior fraccionamiento del polisacárido.<sup>19</sup>

\* (La solución de KOH, varía su concentración y volumen, siendo estos parámetros de estudio).

## FRACCIONAMIENTO DEL CARRAGENANO SEMIRREFINADO



**Figura 9.** Proceso de extracción y fraccionamiento de los carragenanos.<sup>19</sup>

\* (La solubilización del compuesto se produce cuando las algas se llevan a baño maría, variando en esta paso, la temperatura y el tiempo; parámetros de estudio).

## **4.5 CARACTERIZACIÓN**

La caracterización del carragenano presente en las muestras, para cada una de las diferentes variables; se utilizó la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF), siendo esta técnica una de las más útiles para la identificación de estructuras de polisacáridos, que se basa en el análisis de los picos de absorción a números de onda características ( $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>26,27</sup>

### **4.5.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IR-TF)**

Los análisis por IR se llevaron a cabo con pastillas de KBr, en una proporción aproximada de 1:10, en un equipo Thermo modelo IR200. Los grupos éster sulfatos se evidenciaron con la presencia de bandas intensas entre los  $1240\text{-}1250\text{ cm}^{-1}$ . Los carbohidratos sulfatados también muestran bandas menos intensas en  $800\text{-}850\text{ cm}^{-1}$ ; la posición exacta depende de la naturaleza del entorno del grupo sulfato; si es primario, secundario ecuatorial o secundario axial, absorbiendo a  $820$ ,  $830$ , y  $850\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.<sup>26,28,29</sup>

### **4.5.2. Segunda derivada de IR-FT**

La segunda derivada se calculó por medio del Software OriginPro<sup>®</sup> (OriginLab Corporation<sup>®</sup> 1991-2011, versión 8.5.1)<sup>30</sup>, a partir de las absorciones en la región comprendida entre  $1750\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ , usando el algoritmo de Savitzky-Golay, con suavizado de cinco puntos y un polinomio de segundo grado.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 PROCESO DE EXTRACCIÓN

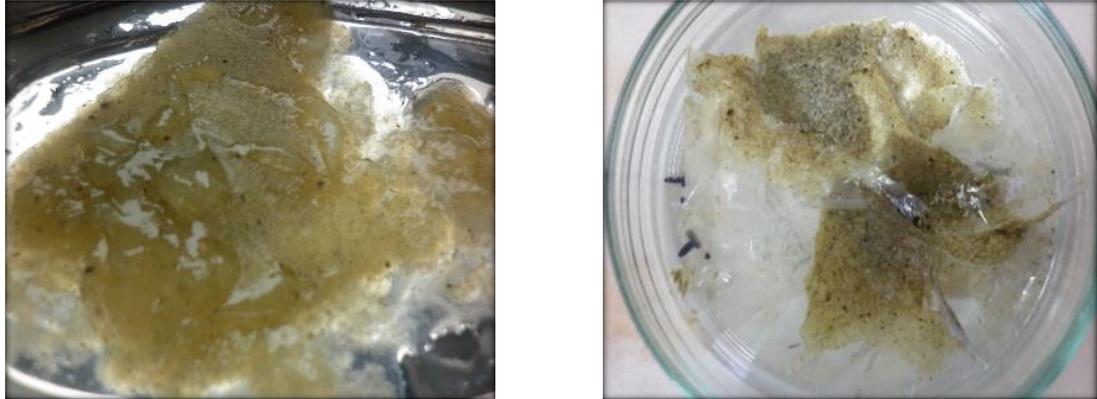
#### 5.1.1. Tratamiento alcalino en frío

La extracción de los carragenanos realizado, involucra todas las etapas esenciales hasta conseguir la refinación, iniciando con una limpieza (Figura 10), con el lavado continuo hasta que el agua se muestra incolora. De esta manera se eliminaron del alga el exceso de tierra y sales provenientes del mar; seguido por el tratamiento alcalino en frío, donde además de la transformación de la unidad D a la unidad AD (Figura 3), la disminución de la



**Figura 10.** Algas lavadas con agua destilada, previas a secado. (Fuente: Presente investigación)

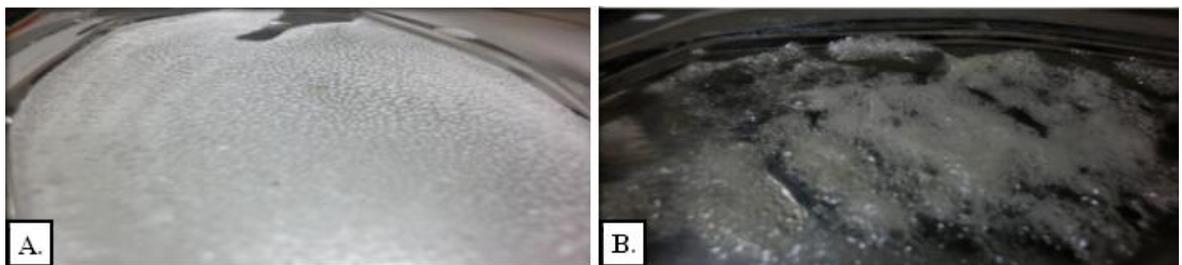
solubilidad y lograr separar los tipos de carragenanos; se llevó el material a una temperatura de  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  para realizar una lisis de las células a través del hinchamiento de las mismas, a causa del agua retenida; consiguiendo que los carragenanos presentes en la muestra estén libres, siendo conocida esta muestra como carragenano semirrefinado (Figura 11). Se observó además, la pérdida de la estructura del alga, obteniendo un compuesto coloidal tipo gel, que al secar presentó una forma laminar con un alto contenido de material celulósico (Figura 11, derecha). Esta forma de carragenano no es del todo comercial debido a la presencia de impurezas, por lo cual la muestra requirió un proceso de refinamiento.



**Figura 11.** Producto del tratamiento alcalino en frío. Izquierda, carragenano semirrefinado sin secar. Derecha, carragenano semirrefinado secado entre 42-45 °C. (Fuente: Presente investigación)

### 5.1.2. Fraccionamiento del carragenano semirrefinado

A la totalidad del carragenano semirrefinado obtenido en 5.1.1, se le realizó una purificación y fraccionamiento; el cual es, un proceso de refinamiento de cada tipo de carragenano presente en la muestra semirrefinada, basándose en las diferencias de solubilidad en agua. Se obtuvieron dos tipos de productos, después del secado entre 42-45 °C; uno insoluble, como un polvo blanco fino (Figura 12, A); y otro soluble, que presentaba una estructura quebradiza debido a la precipitación y coagulación con el alcohol isopropílico (Figura 12, B).



**Figura 12.** Productos obtenidos a partir de la especie *Catenella impudica*; después del secado entre 42-45 °C. A) Carragenano insoluble. B) Carragenano soluble (Fuente: Presente investigación)

### 5.1.3. Rendimientos de la extracción

Los rendimientos obtenidos para el carragenano semirrefinado, y los refinados, son resumidos en la tabla A1 (Ver anexo A). Los rendimientos de los carragenanos reportados, se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{W}{W_f} \times 100$$

Donde, %C es el rendimiento de la extracción del carragenano, W es el peso en gramos del compuesto obtenido (semirrefinado o refinado) y  $W_f$ , es el peso en gramos de la muestra de alga con un secado extra a 60 °C.

El estudio estadístico del rendimiento de la extracción del carragenano semirrefinado (Tabla 3), se realizó mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA), en función de la concentración del KOH (%), mediante el software STATGRAPHIC Centurion XV<sup>25</sup>, observándose que no hay diferencia significativa entre los valores de las medias de las concentraciones de KOH empleadas en la extracción ( $p < 0.05$ ) (Ver anexo B) y por consiguiente que el rango de concentración de KOH (%) empleadas, no afectan el rendimiento del carragenano, sino que solamente proporciona el medio adecuado para la formación del anillo en la unidad 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactopiranososa (Unidad AD). Además se tiene un promedio de rendimiento del 38,99 %, alcanzando valores de hasta 50,66 %, indicando que el tratamiento alcalino en frío no solamente transforma las unidades  $\alpha$ -D-galactopiranososa (Unidad D) a unidades 3,6-anhidro- $\alpha$ -D-galactopiranososa (Unidad AD), sino también la purificación parcial del carragenano mediante la eliminación de azúcares simples, proteínas y minerales ( $\text{Ca}^{2+}$ ), las cuales hacen un aporte significativo en el peso del alga.<sup>1,31</sup> Se logra además la eliminación del pigmento característico rojo (ficobilina), evidenciándose por la coloración verde del carragenano semirrefinado (Figura 11). De los

mayores rendimientos obtenidos del semirrefinado como las pruebas 9 y 13, no se obtuvieron rendimientos de carragenanos refinados altos lo que indicaría la presencia de un elevado grado de impurezas, para esas condiciones.

**Tabla 3.** Rendimientos de los carragenanos semirrefinado y refinados. (Ver anexo A)

RENDIMIENTO DE LOS CARRAGENANOS DE LA <i>Catenella</i> <i>impúdica</i>				
Prueba	*Rendimiento Semirrefinado (%)	*Rendimiento Insoluble (%)	*Rendimiento Soluble (%)	*Rendimiento Total (%)
1	34,11	9,65	12,87	22,52
2	42,10	6,37	12,19	18,56
3	47,88	3,63	6,95	10,58
4	37,68	5,80	5,72	11,52
5	25,68	5,02	3,69	8,71
6	35,17	10,74	7,21	17,95
7	42,31	10,71	8,68	19,39
8	43,66	4,09	8,14	12,23
9	48,74	1,50	8,16	9,66
10	41,93	4,75	9,15	13,90
11	35,91	2,90	7,27	10,17
12	30,61	8,69	3,37	12,06
13	50,66	6,20	10,59	16,79
14	32,19	6,46	5,90	12,36
15	12,90	6,20	0,00	6,20
16	47,99	4,69	11,72	16,41
17	47,01	6,28	6,69	12,97
18	45,25	6,45	10,50	16,95

\* Rendimiento en base a  $W_f$  (peso de la muestra con secado extra a 60 °C).

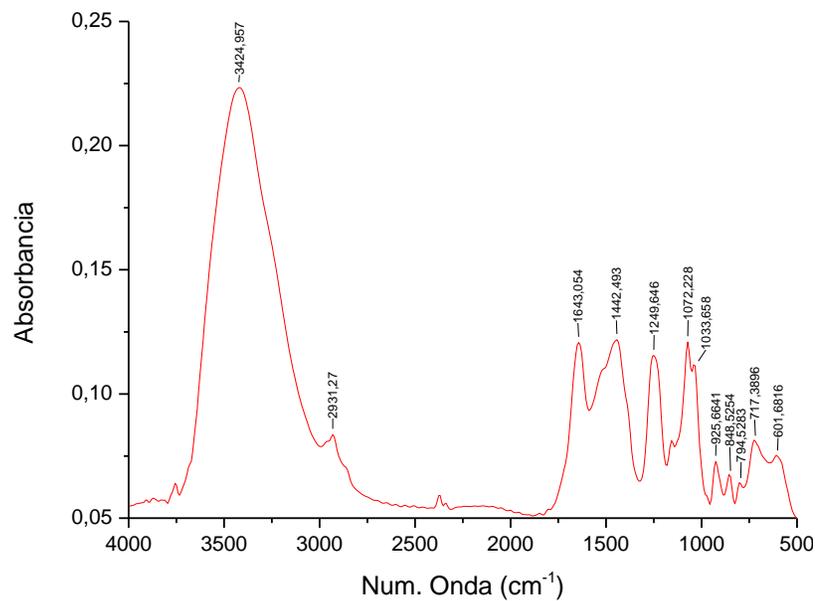
El carragenano al ser un hidrato de carbono, es por consiguiente un componente energético para las algas rojas, afectado por factores endógenos y exógenos.<sup>32</sup> Los rendimientos de los carragenanos refinados (Tabla 3), están muy relacionados con la fase de vida del alga, encontrándose que para el alga del orden Gigartinales en fase gametofita haploide

predomina el  $\kappa$ -carragenano y en fase tetrasporofita diploide predomina el  $\lambda$ -carragenano.<sup>9, 12, 23, 31-33</sup> Además, las síntesis de carbohidratos se relaciona a períodos de máximo crecimiento, incrementos en la actividad fotosintética y una reducción en el contenido proteico,<sup>34</sup> indicando que para la muestra del alga de estudio, se presenta una mezcla de algas en diferentes fases de vida al no presentarse una superioridad en el rendimiento, de un compuesto sobre el otro.

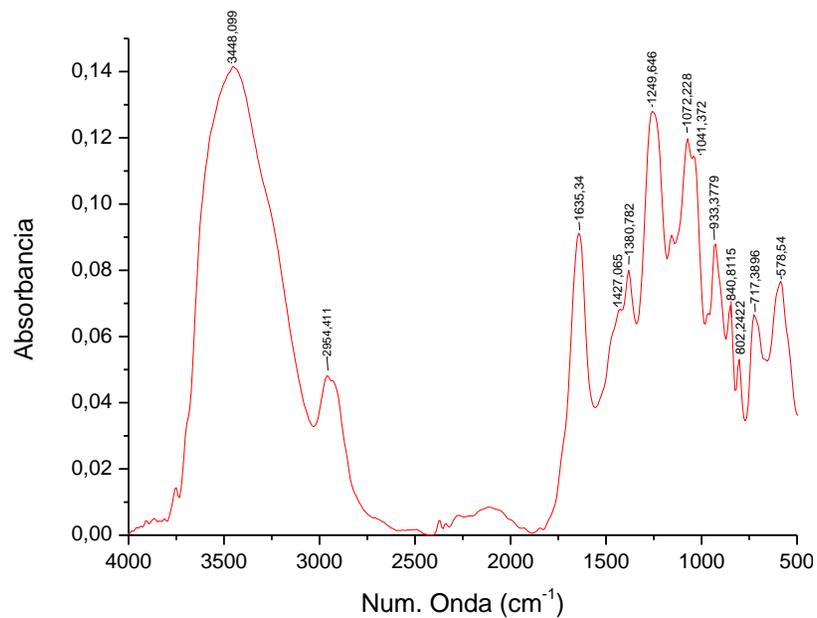
## **5.2 CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR-FT)**

Los grupos funcionales característicos de los carragenanos refinados obtenidos, se identificaron mediante la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier, comparando bandas características de los espectros con los reportados en la literatura.<sup>26-30</sup>

En las figuras 13 y 14 se pueden observar los espectros obtenidos para el carragenano insoluble y soluble, respectivamente (Ver anexo C). En los cuales, de forma general; en la región comprendida entre  $3600-1600\text{ cm}^{-1}$  se pueden apreciar tres bandas. La primera que es ancha, intensa y simétrica alrededor de los  $3424-3448\text{ cm}^{-1}$ , es asignada a la vibración de estiramiento de los grupos O-H. La segunda banda, que es débil; entre los  $2931-2954\text{ cm}^{-1}$  debida a la vibración de estiramiento del C-H alifático. Y la tercera banda de intensidad fuerte, entre  $1643-1635\text{ cm}^{-1}$  asignada a la presencia de las vibraciones de estiramiento entre C-C del anillo.<sup>37</sup>



**Figura 13.** Espectro infrarrojo del carragenano insoluble de la *Catenella impudica*.

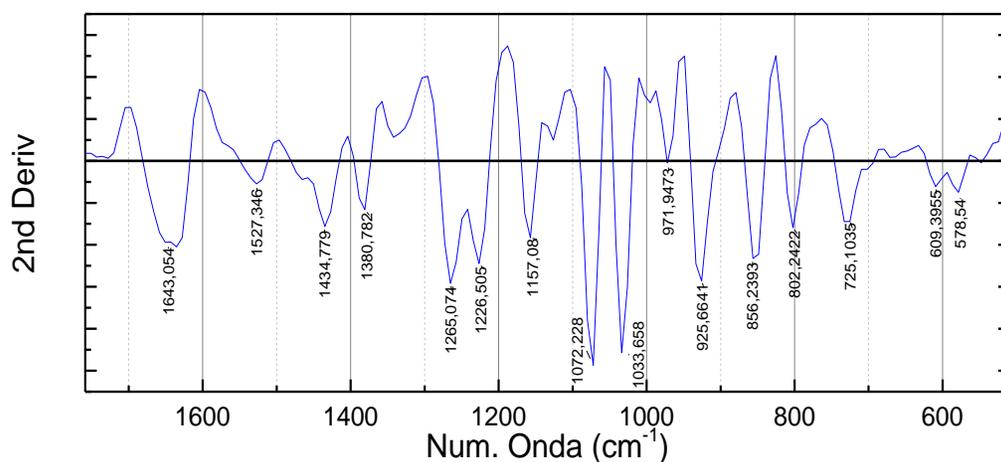


**Figura 14.** Espectro infrarrojo del carragenano soluble de la *Catenella impudica*.

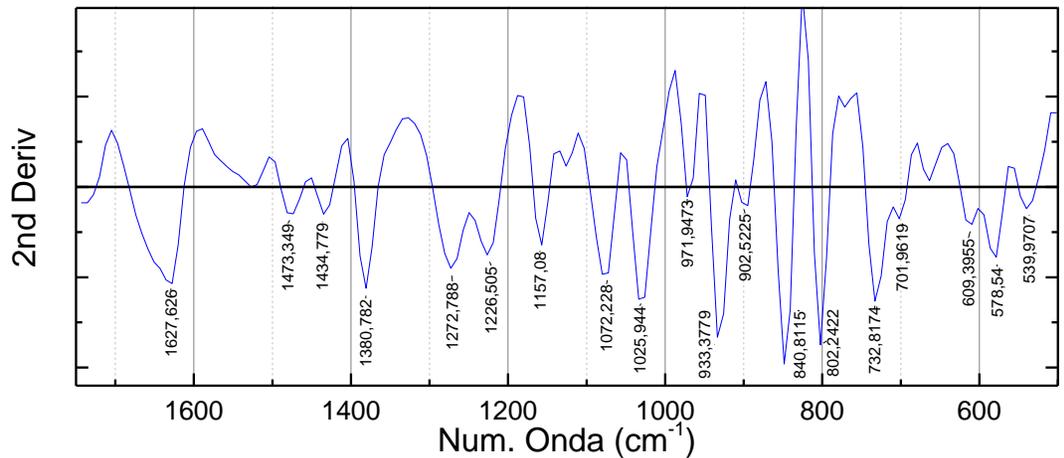
La banda que se aprecia a aproximadamente  $1249\text{ cm}^{-1}$ , la cual es una banda general para los carragenanos; se atribuye a la vibración de estiramiento asimétrico del grupo sulfato

(S=O). Además, las bandas que aparecen alrededor de  $1072\text{ cm}^{-1}$  y  $930\text{ cm}^{-1}$ , son asociadas a la presencia del anillo C3-O-C6 de la unidad de anhidro-galactopiranososa (AD).<sup>36</sup> De acuerdo a lo anterior, se indicaría que los carragenanos refinados extraídos de la *C. impudica*, presentan dentro de su estructura unidades AD debido al tratamiento alcalino en frío aplicado. No obstante, para lograr la caracterización de los carragenanos de la *C. impudica*; se evaluó la segunda derivada de los espectros, debido a la poca resolución de las bandas en la región anomérica.

La segunda derivada aplicada a los espectros de las muestras (Ver anexo C), presentan mínimos en la posición de las bandas de absorción del espectro original, aumentando la resolución cuando se encuentran solapadas o débiles, especialmente en la región anomérica o de huella dactilar ( $950\text{-}700\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>38</sup> En las figuras 15 y 16 se pueden observar la aplicación de la segunda derivada a los espectros de los carragenanos insoluble y soluble, respectivamente.



**Figura 15.** Segunda derivada del espectro infrarrojo del carragenano insoluble de la *Catenella impudica*, entre  $1750\text{-}500\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 16.** Segunda derivada del espectro infrarrojo del carragenano soluble de la *Catenella impudica*, entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$ .

En el espectro de la segunda derivada del carragenano insoluble (Figura 15), aparecen bandas que en el espectro original no se pueden observar. Presenta una banda a 856,2  $\text{cm}^{-1}$  que puede ser asignada a la galactopiranos-4-sulfato (G4S), encontrándose en  $\kappa$ - y  $\iota$ -carragenano. La presencia de  $\iota$ -carragenano se confirma con la banda a 802,2  $\text{cm}^{-1}$ , debida a la 3,6-anhidro-galactopiranos-2-sulfato (AD2S), mostrando ausencia de esta vibración para  $\kappa$ -carragenano. Por lo tanto, la presencia de estas bandas y con la de 925,7  $\text{cm}^{-1}$  de la unidad AD; confirman que el compuesto extraído de la *Catenella impudica* e identificado como carragenano insoluble, corresponde al tipo híbrido  $\kappa/\iota$ -carragenano,<sup>27</sup> el cual es una mezcla de cadenas, conteniendo ambas unidades ( $\kappa$ -,  $\iota$ -) o de igual forma, con la galactopiranos-4-sulfato y la 3,6-anhidro-galactopiranos-2-sulfato.<sup>21, 27</sup>

En el espectro de la segunda derivada del carragenano soluble (Figura 16), se pueden observar bandas a 933,4  $\text{cm}^{-1}$  y a 902,5  $\text{cm}^{-1}$ , indicando la presencia de C-O-C y la sulfatación en C2 de la unidad anhidro-galactopiranos, respectivamente. Con estas bandas y con la presencia de la banda a 1025,9  $\text{cm}^{-1}$  asignada al estiramiento simétrico en C2 de S=O, y 802,2  $\text{cm}^{-1}$  indicarían que el compuesto extraído de la *Catenella impudica* e

identificado como carragenano soluble, corresponde al tipo  $\theta$ -carragenano, el cual es el producto de la conversión de  $\lambda$ -carragenano por el tratamiento alcalino en frío.

### 5.3 SUPERFICIE DE RESPUESTA

Para el análisis de superficie de respuesta elaborado mediante el software STATGRAPHIC® Centurion XV<sup>25</sup>, se utilizaron los rendimientos que se resumen en la tabla A1 (Ver anexo A). La optimización de extracción se analizó por separado para cada tipo de carragenano caracterizado.

#### 5.3.1. $\kappa/\iota$ -carragenano (insoluble)

Las tablas y figuras que se presentan a continuación son los resultados obtenidos por el software STATGRAPHIC® Centurion XV<sup>25</sup> para la optimización de  $\kappa/\iota$ -carragenano de la especie de alga, *Catenella impudica*.

La tabla 4 muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la variable de respuesta del rendimiento de  $\kappa/\iota$ -carragenano.

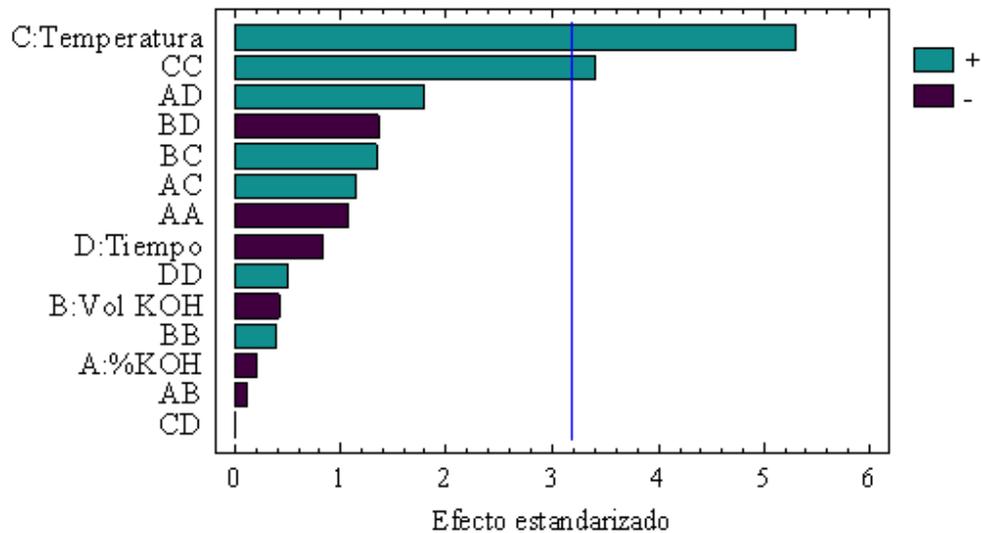
**Tabla 4.** Análisis de varianza para  $\kappa/\iota$ -carragenano.<sup>25</sup>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:%KOH	0,0784072	1	0,0784072	0,05	0,8417
B:Vol KOH	0,298764	1	0,298764	0,18	0,6995
<b>C:Temperatura</b>	46,5633	1	46,5633	28,14	0,0131
D:Tiempo	1,16419	1	1,16419	0,70	0,4632
AA	1,88861	1	1,88861	1,14	0,3637
AB	0,0269097	1	0,0269097	0,02	0,9066
AC	2,16736	1	2,16736	1,31	0,3355
AD	5,31972	1	5,31972	3,21	0,1709
BB	0,258198	1	0,258198	0,16	0,7193

BC	2,98241	1	2,98241	1,80	0,2720
BD	3,06295	1	3,06295	1,85	0,2669
<b>CC</b>	19,2136	1	19,2136	11,61	0,0422
CD	0,000423405	1	0,000423405	0,00	0,9882
DD	0,418857	1	0,418857	0,25	0,6495
Error total	4,96463	3	1,65488		
Total (corr.)	109,012	17			
$R^2 = 95,45\%$					

El análisis de varianza (ANOVA), indica que variables son las influyentes en el proceso, con un intervalo de confianza del 95%. El valor de cada factor o interacción que se reportan en la última columna de la tabla 4, menores a  $p < 0,05$  serán estimados como los más relevantes para obtener el mayor rendimiento de  $\kappa$ /t-carragenano. Estos son: El factor temperatura y su auto interacción (CC). El modelo planteado presenta un excelente ajuste, ya que se obtuvo una alta correlación ( $R^2$ ) de 95,45 %, minimizándose las posibles causas de error a un 4,55 % restante.

La influencia de los factores sobre el proceso se pueden observar de la misma forma, y en su respectivo orden; en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 13), siendo este una representación gráfica del análisis de varianza (ANOVA). Los efectos de color azul (+) son efectos directamente proporcionales y los del color morado (-) inversamente proporcionales a la variable de respuesta.

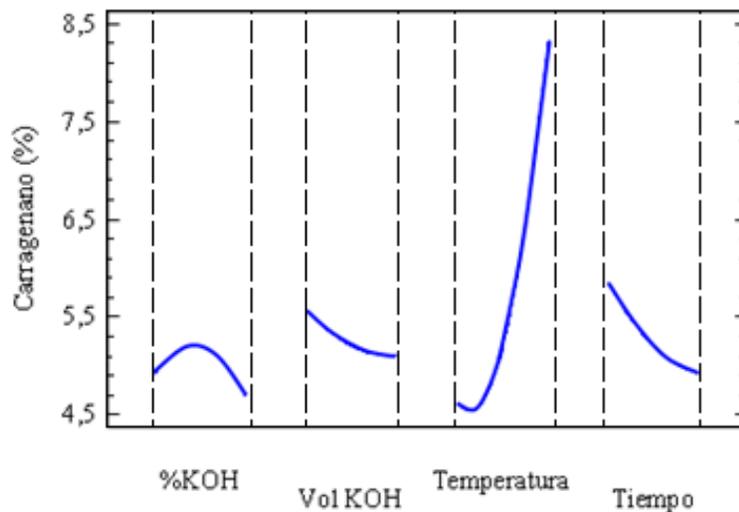


**Figura 17.** Diagrama de Pareto estandarizado para la extracción de  $\kappa/\iota$ -carragenano de la *Catenella impudica*.<sup>25</sup>

El diagrama incluye una línea vertical azul cuya ubicación depende del intervalo de confianza trabajado, siendo del 95% para este caso. Los efectos que sobrepasan la línea vertical se consideran como los más significantes para el proceso. Estos son, en su orden, temperatura y la interacción de esta. Indicando que un cambio en la temperatura tiene un efecto más notable sobre el rendimiento de  $\kappa/\iota$ -carragenano que cualquier variación de otro efecto, siendo por tanto la temperatura la de mayor importancia para el control del proceso. Observando de nuevo los rendimientos reportados en la tabla 3, los mayores rendimientos de este tipo de carragenano se alcanzan a 90 y 93.4 °C (pruebas 1, 6, 7, 12), y los rendimientos bajan significativamente cuando la temperatura también lo hace.

El efecto de cada variable sobre el rendimiento de  $\kappa/\iota$ -carragenano, se puede observar en la figura 18. La representación de cada variable: la concentración y el volumen de KOH, la temperatura y el tiempo, exponen pendientes que representan la significancia sobre el proceso y la sensibilidad de la variable de respuesta a estos factores, apreciándose que el factor que presenta mayor pendiente es la temperatura mostrando de igual forma, que a

variaciones de temperatura se presentará un cambio significativo en el rendimiento de  $\kappa/\iota$ -carragenano. Los otros factores no presentan pendientes significativas y por tanto la variación de ellos no muestra cambios significativos en el rendimiento, pero logran mayores rendimientos a valores medios del porcentaje de KOH (%) y valores extremos de volumen de KOH y tiempo.



**Figura 18.** Gráfica de los efectos principales para  $\kappa/\iota$ -carragenano.<sup>25</sup>

Con la tabla 5 se demuestra el buen ajuste del modelo empleado mediante la comparación de los resultados experimentales del rendimiento y los valores ajustados o exhibidos por el mismo modelo, apreciando una clara similitud entre ellos, justificando o demostrando la alta correlación conseguida de 95,45 %. Se determina que por medio del modelo empleado se puede optimizar la extracción de  $\kappa/\iota$ -carragenano, a partir de la *Catenella impudica*.

**Tabla 5.** Estimación de los resultados para la extracción de  $\kappa/\iota$ -carragenano de la *Catenella impudica*.<sup>25</sup>

	<b>Observados</b>	<b>Ajustados</b>
<b>Prueba</b>	<b>Rend. (%)</b>	<b>Rend. (%)</b>
1	9,65	9,10
2	6,37	6,62
3	3,63	3,83
4	5,80	6,00
5	5,02	5,23
6	6,46	5,70
7	10,70	10,15
8	4,09	4,30
9	1,50	1,76
10	4,75	4,97
11	2,90	3,16
12	8,69	8,14
13	6,21	5,20
14	6,46	6,72
15	6,20	5,65
16	4,69	5,20
17	6,28	6,49
18	10,74	11,91

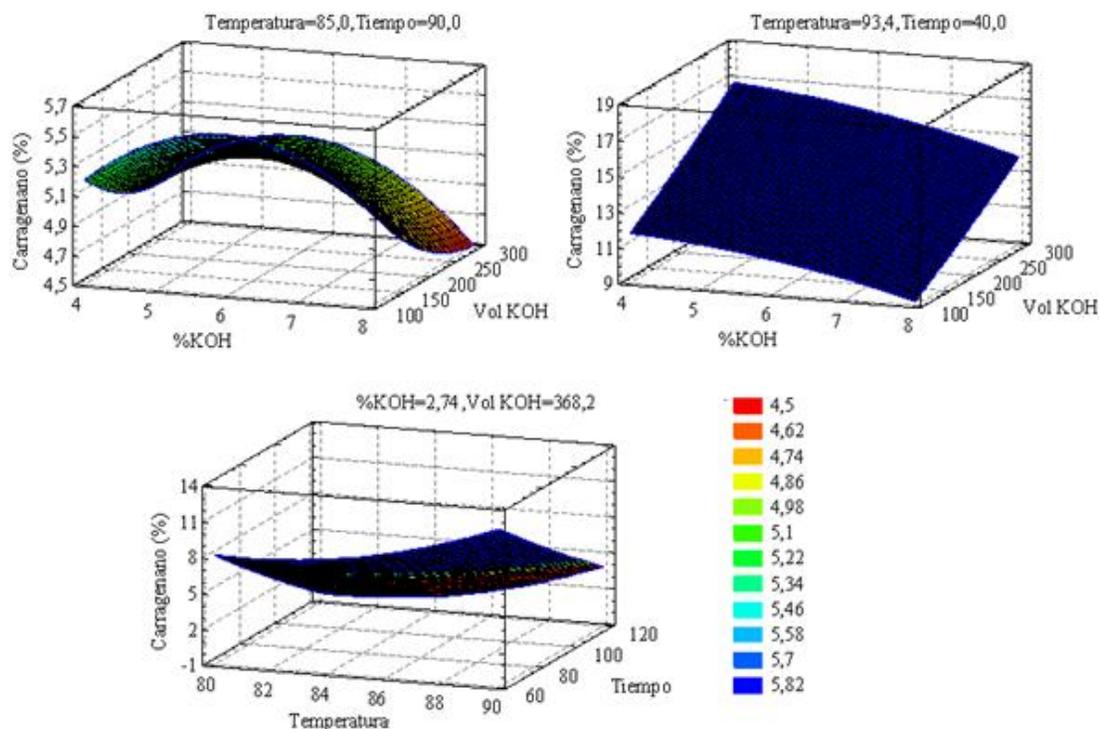
En la tabla 6 se resume los valores de los parámetros encontrados para el máximo rendimiento de  $\kappa/\iota$ -carragenano, en la cual los valores de optimización se hallan dentro del rango determinado previamente en el diseño del experimento, aunque con orientación a estar ubicados en puntos extremos de cada factor.

**Tabla 6.** Optimización del proceso para  $\kappa/\iota$ -carragenano.<sup>25</sup>

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
KOH (%)	2,7	9,4	2,74
Vol. KOH (mL)	31,8	368,2	368,2
Temperatura (°C)	76,6	93,4	93,03
Tiempo (min.)	40,0	140,0	40,0

En la figura 19 se observa gráficamente las superficies de respuestas, en la que se muestra una superficie en ascenso donde el valor óptimo se representa en el punto máximo de la superficie. Todas las superficies difieren entre sí en los factores constantes, teniendo en cuenta que solo se necesitan dos factores en variación mientras los otros dos permanecen constantes para modelar el diseño y observar el cambio en el rendimiento. Nótese que en la superficie de respuesta se muestran diferentes contornos, donde cada uno de ellos corresponde a un rango de rendimiento obtenido, pronosticado por el modelo e ilustrando la forma en que este responde a las variaciones de los factores.

Cuando la temperatura y tiempo permanecen constantes en el valor medio, la superficie muestra que los valores máximos de rendimiento (~5,46 %), se logran cuando la concentración se acerca a valores medios y el volumen a valores bajos. Utilizando los valores de optimización como constantes para cada factor, se puede ver los valores de rendimientos máximos, específicamente cuando se deja la temperatura a 93,4 °C y tiempo de 40,0 min., el máximo rendimiento es aproximadamente de 17 % cuando la concentración se acerca a 4 % y el volumen a 300 mL.



**Figura 19.** Superficie de respuesta para  $\kappa/\lambda$ -carragenano. Superior izquierda, variación de  $\kappa/\lambda$ -carragenano con respecto a %KOH y volumen de KOH con temperatura y tiempo a nivel medio. Superior derecha, variación de  $\kappa/\lambda$ -carragenano con respecto a %KOH y volumen de KOH con temperatura y tiempo en nivel óptimo. Inferior, variación de  $\kappa/\lambda$ -carragenano con respecto a temperatura y tiempo con porcentaje y volumen de KOH en nivel óptimo.<sup>25</sup>

### 5.3.2. $\theta$ -carragenano

Las Tablas y Figuras que se presentan a continuación son los resultados obtenidos por el software STATGRAPHIC® Centurion XV<sup>25</sup> para la optimización de  $\theta$ -carragenano de la especie de alga, *Catenella impudica*.

La tabla 7 muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para la variable de respuesta del rendimiento de  $\theta$ -carragenano.

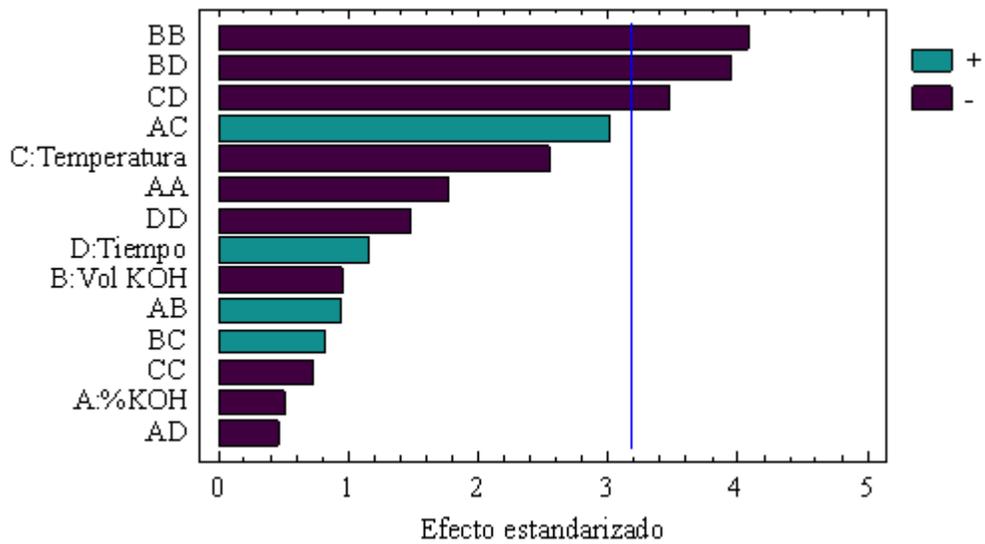
**Tabla 7.** Análisis de varianza para  $\theta$ -carragenano.<sup>25</sup>

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
--------	-------------------	----	----------------	---------	---------

A:%KOH	0,58679	1	0,58679	0,26	0,6453
B:Vol KOH	2,06289	1	2,06289	0,91	0,4096
C:Temperatura	14,6413	1	14,6413	6,49	0,0842
D:Tiempo	3,03959	1	3,03959	1,35	0,3298
AA	7,0898	1	7,0898	3,14	0,1745
AB	2,0321	1	2,0321	0,90	0,4127
AC	20,4573	1	20,4573	9,06	0,0572
AD	0,469588	1	0,469588	0,21	0,6793
BB	37,676	1	37,676	16,69	0,0265
BC	1,51006	1	1,51006	0,67	0,4733
BD	35,2179	1	35,2179	15,60	0,0289
CC	1,17633	1	1,17633	0,52	0,5225
CD	27,1655	1	27,1655	12,03	0,0404
DD	4,92437	1	4,92437	2,18	0,2362
Error total	6,77205	3	2,25735		
Total (corr.)	186,065	17			
$R^2 = 96,36\%$					

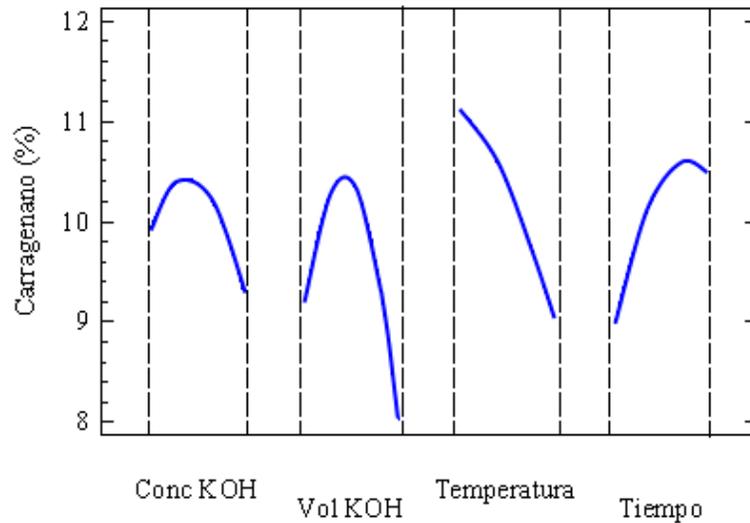
El análisis de varianza (ANOVA), indica que variables con mayor influencia en el proceso ( $p < 0,05$ ) para  $\theta$ -carragenano, son las interacciones entre el volumen:volumen de KOH, volumen de KOH y el tiempo, y temperatura:tiempo. Teniendo que el ajuste del modelo es del 96,36 %, minimizándose las posibles causas de error a un 3,64%.

La influencia de los factores sobre el proceso se pueden observar de la misma forma, y en su respectivo orden; en el diagrama de Pareto estandarizado (Figura 20). Resumiendo, los efectos de color azul (+) son efectos directamente proporcionales y los del color morado (-) inversamente proporcionales a la variable de respuesta. Se tiene que los efectos de las variables estudiadas no son significativas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, la interacción de algunos factores si presentan efectos significativos sobre el proceso de extracción de una manera inversamente proporcional al rendimiento de  $\theta$ -carragenano. Para observar el efecto de estas interacciones ver la figura 22.



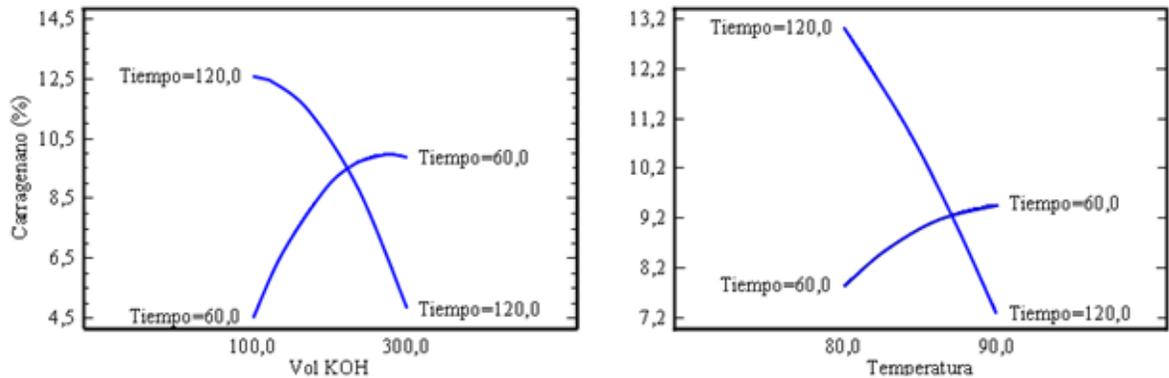
**Figura 20.** Diagrama de Pareto estandarizado de para la extracción de  $\theta$ -carragenano de la *Catenella impudica*.<sup>25</sup>

Por consiguiente la gráfica de los efectos principales (Figura 21), no muestran pendientes pronunciadas que impliquen cambios significantes en el rendimiento de  $\theta$ -carragenano, siendo por tanto de menos importancia para el proceso de acuerdo al análisis de varianza (ANOVA) de la tabla 17. Lo que indica que la variación desde el valor bajo a el alto de cualquier factor no implica cambios significativos en el rendimiento de  $\theta$ -carragenano.



**Figura 21.** Gráfica de los efectos principales para  $\theta$ -carragenano.<sup>25</sup>

El efecto de las interacciones de los factores principales sobre el rendimiento de  $\theta$ -carragenano se observan en la figura 22. Si comparamos las pendientes con las de los efectos principales (Figura 21), notamos la significancia de las interacciones para el proceso según el análisis de varianza. Cuando la extracción se hace por un tiempo de 60,0 min., y se aumenta el volumen de KOH gradualmente, el rendimiento del carragenano es aproximadamente 10,5 %, pero al incrementar el tiempo de extracción a 120 min., y disminuir gradualmente el volumen de KOH, se obtiene un rendimiento mayor de aproximadamente 12,5 %. Caso igual pasa con la interacción entre el tiempo y la temperatura. A tiempos cortos de extracción, y aumentos graduales de la temperatura se alcanza un rendimiento máximo de aproximadamente 9,2 %. Pero cuando el tiempo de extracción se incrementa, y se disminuye la temperatura gradualmente, el rendimiento del carragenano sube a aproximadamente 13,2 %.



**Figura 22.** Efecto de la interacción de factores para  $\theta$ -carragenano. Izquierda, efecto de la interacción del volumen de KOH y el tiempo; derecha, efecto de la interacción de la temperatura y tiempo.<sup>25</sup>

De la misma forma que  $\kappa/\iota$ -carragenano, con la tabla 8 se demuestra el buen ajuste del modelo empleado mediante la comparación de los resultados experimentales del rendimiento y los valores ajustados o exhibidos por el mismo modelo, percibiéndose una clara similitud entre ellos, justificando o demostrando la alta correlación conseguida de 96,36 %. Se determina que por medio del modelo empleado se puede optimizar la extracción de  $\theta$ -carragenano, a partir de la *Catenella impudica*.

En la tabla 9 se resume los valores de los parámetros encontrados para el máximo rendimiento de  $\theta$ -carragenano. Teniendo que los valores de optimización se encuentran dentro del rango determinado previamente en el diseño experimental, aunque con orientación a estar ubicados en puntos extremos de cada factor, a excepción de la concentración de KOH.

**Tabla 8.** Estimación de los resultados para la extracción de  $\theta$ -carragenano de la *Catenella impudica*.<sup>25</sup>

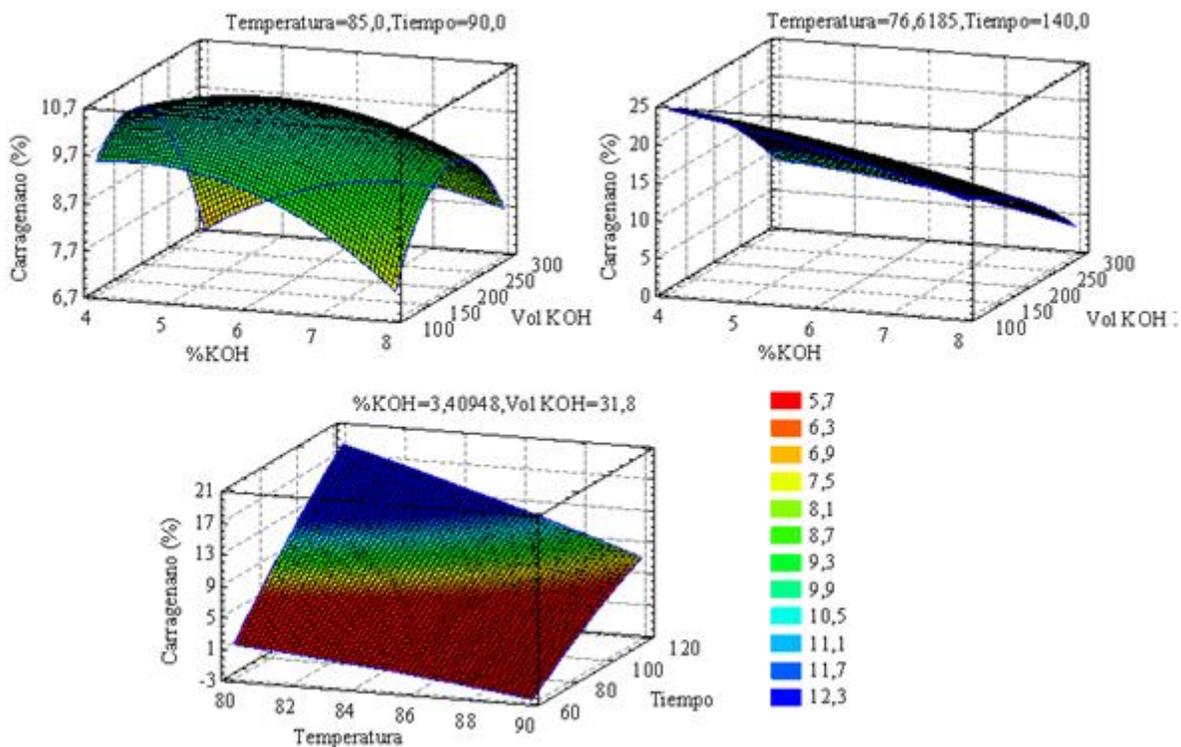
	<b>Observados</b>	<b>Ajustados</b>
<b>Prueba</b>	<b>Rend. (%)</b>	<b>Rend. (%)</b>
1	12,87	12,46
2	12,19	11,69
3	6,95	7,59
4	5,72	6,35
5	3,69	4,32
6	10,50	11,24
7	8,68	8,26
8	8,15	8,80
9	8,17	7,68
10	9,15	9,80
11	7,27	6,78
12	3,37	2,96
13	10,59	10,39
14	5,90	5,41
15	0,0	-0,41
16	11,72	10,39
17	6,69	7,34
18	7,22	7,76

**Tabla 9.** Optimización del proceso para  $\theta$ -carragenano.<sup>25</sup>

<b>Factor</b>	<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>Óptimo</b>
KOH (%)	2,7	9,4	3,41
Vol KOH (mL)	31,8	368,2	31,8
Temperatura (°C)	76,6	93,4	76,61
Tiempo (min)	40,0	140,0	140,0

En la figura 23 se puede observar gráficamente las superficies de respuestas, diferenciándose entre sí, en los factores constantes. Nótese que en la superficie de respuesta se muestran a diferentes contornos, cada uno de ellos corresponde a un rango de rendimiento obtenido, pronosticado por el modelo e ilustrando la forma en que este responde a las variaciones los factores.

Cuando la temperatura y tiempo permanecen constantes en el valor medio, la superficie muestra que los valores máximos de rendimiento se aproximan a 9,9 %, cuando la concentración y volumen se acercan a valores medios. Utilizando los valores de optimización como constantes para cada factor, se puede ver los valores de rendimientos máximos, específicamente cuando se deja la temperatura a 76,62 °C y un tiempo de 140,0min., el máximo rendimiento es aproximadamente de 25 %, cuando los niveles de concentración y de volumen de KOH, están en sus valores bajos de 4 % y 100 mL, respectivamente.



**Figura 23.** Superficie de respuesta para  $\theta$ -carragenano. Superior izquierda, variación de  $\theta$ -carragenano con respecto a %KOH y volumen de KOH con temperatura y tiempo a nivel medio. Superior derecha, variación de  $\theta$ -carragenano con respecto a %KOH y volumen de KOH con temperatura y tiempo en nivel óptimo. Inferior, variación de  $\theta$ -carragenano con respecto a temperatura y tiempo con %KOH y volumen de KOH en nivel óptimo.<sup>25</sup>



## 6. CONCLUSIONES

Las condiciones de optimización de extracción para  $\kappa$ /I-carragenano de la *Catenella impudica*, fueron identificadas mediante la metodología de superficie de respuesta como 2,7 %, 368,2 mL, 93,0 °C y 40 min., para la concentración y el volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo, respectivamente. Por análisis de varianza, se tiene un ajuste del modelo del 95,45%, siendo la temperatura la que presenta mayor influencia para el control del proceso.

Las condiciones de optimización de extracción para  $\theta$ -carragenano de la *Catenella impudica*, fueron identificadas mediante la metodología de respuesta como 3,4 %, 31,8 mL, 76,61 °C y 140,0 min., para la concentración y el volumen de solución alcalina, la temperatura y el tiempo, respectivamente. Por análisis de varianza se tiene un ajuste del modelo del 96,36 %, siendo las interacciones de los factores las que presentan mayor influencia para el control del proceso.

Los rendimientos de los carragenanos refinados de la *Catenella impudica*, al no observarse un predominio de un tipo de carragenano sobre el otro; indicarían que la muestra de alga de estudio presentaría una mezcla de algas en diferentes fases de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Peña E.J., Palacios M.L. y Ospina-Álvarez, N. Algas Como Indicadores De Contaminación. Universidad del Valle Ed. Cali-Valle. 2005. 35-36, 38-43.
2. Murillo M.M., Descripción de las fases reproductivas del alga roja *Catenella impudica*. Trabajo de grado. Universidad del Valle. Biología. Cali - Valle. 2010.
3. Guiry M.D. & Guiry G.M. 2011. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 09 December 2011.
4. Estupiñan R.A. y Velasco S. 2007. Algas asociadas a un manglar en el Pacífico Colombiano. Municipio de Buenaventura – Valle del Cauca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 5, 84-89.
5. Peña E.J. 1998. Physiological ecology of benthic algae associated with mangrove roots in the Pacific Coast of Colombia. Tesis doctoral. University of South Carolina, USA.
6. Campo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr. D.B., Carvalho I. 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis (Review). *Carbohydrate Polymers*. 77, 167–180.
7. Antonopoulos A., Favetta P., Helbert W., Lafosse M. 2004. Isolation of  $\kappa$ -carrageenan oligosaccharides using ion-pair liquid chromatography - Characterization by electrospray ionisation mass spectrometry in positive-ion mode. *Carbohydrate Research*. 339, 1301-1309

8. van de Velde F. 2008. Structure and function of hybrid carrageenans (Review). *Food Hydrocolloids*. 22, 727–734.
9. Falshaw R., Bixlerb H.J., Johndro, K. 2003. Structure and performance of comercial k-2 carrageenan extracts. Part III. Structure analysis and performance in two dairy applications of extracts from the New Zealand red seaweed, *Gigartinaatropurpurea*. *Food Hydrocolloids*. 17, 129–139.
10. Campo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr. D.B., Carvalho I. 2009. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis (Review). *Carbohydrate Polymers*. 77, 167–180.
11. van de Velde F., Antipova A.S., Rollema H.S., Burova T.V., Grinberg N V., Pereira L., Gilsenan P.M., Tromp R.H., Rudolphe B., y Grinbergc B.Y. 2005. The structure of  $\kappa/\iota$ -hybrid carrageenans II. Coil–helix transition as a function of chain composition. *Carbohydrate Research*. 340, 1113–1129.
12. Solis, I.M. 2007. Estudio Comparativo de las Propiedades Finales de Extractos de Carragenina  $\kappa$ -I /  $\kappa$ -II Utilizando Distintas Algas Productoras de Carragenina  $\kappa$ -II. Trabajo de Grado. VALDIVIA – CHILE.
13. Roberts M.A., y Quemener B. 1999. Measurement of carrageenans in food: challenges, progress, and trends in analysis (R). *Trends in Food Science & Technology*. 10, 169-181.
14. Arnott S., Scott W.E., Rees D.A., McNab C.G. 1974 (Modified 2009). Iota-carrageenan: molecular structure and packing of polysaccharide double helices in oriented fibres of divalent cations salts. *J. Mol. Biol.* 90, 253-267. PubMed: 4453016. World-wide electronic publication, Protein Data Bank (PDB), Research Collaboration

for Structural Bioinformatics (RSCB). <http://www.rcsb.org>; searched on 03January, 2012.

15. Carlucci M.J., Ciancia M., Matulewicz M.C., Cerezo A.S., Damonte E.B. 1999. Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Research*. 43, 93–102.
16. Carlucci M.J., Scolaro L.A., Nosedá M.D., Cerezo, A.S. Damonte, E.B. 2004. Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Research*. 64, 137–141.
17. Carlucci M.J., Pujol C.A., Ciancia, M., Nosedá M.D., Matulewicz, M.C., Damonte, E.B., Cerezo A.S. 1997. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartinas kottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. 20, 97-105.
18. Gökçe, M., Utku, S., Küpeli, E. 2009. Synthesis and analgesic and anti-inflammatory activities 6-substituted-3(2*H*)-pyridazinone-2-acetyl-2-(*p*-substituted/nonsubstituted benzal)hydrazone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 9, 3760-3764.
19. Salas De la T. N., Córdova C., Estrada E., 2008. Obtención de  $\kappa$ -carragenano y  $\lambda$ -carragenano a partir de macro alga *Chondracanthus chamissoi* y su aplicación en la industria alimentaria. *Revista de la Facultad de Ingeniería Industrial. Universidad Nacional San Marcos. Lima - Perú*. 11, 52-58.

20. Falsahw, R., Furneaux, R.H., and Stevenson, D.E. 2005. Structural analysis of carrageenans from the red alga, *Callophyllis hombroniana* Mont. Kütz (Kallymeniaceae, Rhodophyta). Carbohydrate Research. 340, 1149-1158.
21. van de Velde F., Knutsen H.S., Usov A.I., Rollema H.S., and Cerezo A.S. 2002. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans; Application in research and industry (Review). Trend in Food Science & Technology. 13, 73-92.
22. De Ruiter G.A., Rudolph B. 1997. Carrageenan biotechnology. Trends in Food Science & Technology. 8, 389-395
23. Ciancia M., Nosedá M.D., Matulewicz M.C., Cerezo A. S. 1993. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. Carbohydrate Polymer. 20,95-98.
24. Falshaw R., Bixler H.L., Johndro K. 2001. Structure and performance of commercial kappa-2-carrageenan extracts. I. Structure analysis. Food Hydrocolloids. 15, 441-452.
25. STATGRAPHIC® Centurion XV. © 2006 by StatPoint, Inc. [www.statgraphic.com](http://www.statgraphic.com)
26. Prado-Fernández J., Rodríguez-Vasquez J.A., Tojo E., Andrade J.M. 2003. Quantitation of κ- ι- and λ-carrageenans by mid-infrared spectroscopy and PLS regression. Analitica Chimica Acta. 480, 23-37.
27. Gómez-Ordoñez E., Ruperéz P. 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. Food Hydrocolloids. 25, 1514-1520.

28. Horton D. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press Ed. Elsevier. San Diego, CA. USA. Volumen 65. 2011
29. Tojo E., Prado J. 2003. Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method. *Carbohydrate Research*. 338, 1309–1312
30. OriginPro<sup>®</sup>. © 2011 by OriginLab Corporation. [www.OriginLab.com](http://www.OriginLab.com)
31. Ortiz V.J. *Composición Nutricional y Funcional de Algas Rodifíceas Chilenas (Monografía)*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. 2011.
32. López A.L.M., Pacheco R.I., Hernández G.E.H., Zertuche G.J.A. 2002. Caracterización del carragenano de *Chondracantus Pectinatus* (Rhodophyta; Gigartinales). *Ciencias Marinas*. 28, 311-318.
33. Herrera A.M. 2005. Variación mensual de los contenidos energéticos, porcentaje de rendimiento de carragenanos y análisis químico de los carragenanos en las fases del ciclo de vida de *Chondrachantus chamissoi* (C.Agardh) Kutzing, 1843 (Rhodophyta, Gigartinales) en Coquimbo Chile. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.
34. Van de Velde F., Peppelman H.A., Rollema H.S., Tromp, R.H. 2001. On the structure of  $\kappa/\iota$ -hybrid carrageenans. *Carbohydrate Research*., 331, 271–283.
35. Marinho-Soriano, E., Fonseca, P.C., Carneiro, M.A., Moreira, W.S.C. 2006. Seasonal variation in the chemical composition of two tropical seaweeds. *Bioresource Technology*. 97, 2402–2406.

36. Pereira, L., Amado, A.M., Critchley, A.T., van de Velde, F., Ribeiro-Claro, P.J.A. 2009. Identification of selected seaweed polysaccharides (phycocolloids) by vibrational spectroscopy (FTIR-ATR and FT-Raman). *Food Hydrocolloids*. 23, 1903-1909.
37. Leal, D., Matsuhira, B., Rossi, M. and Caruso, F. 2008. FT-IR spectra de alginic acid block fractions in three species of brown seaweed. *Carbohydrate Research*. 343, 308-316.
38. Macho, A.S. 2002. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS BASADAS EN LA ESPECTROSCOPIA INFRARROJO Y CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE. APLICACIÓN A LA INDUSTRIA PETROQUÍMICA. Tesis Doctoral. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona, España.

**ANEXOS**

**ANEXO A:** Datos y resultados para el carragenano semirrefinado, y refinados ( $\kappa/\iota$  y  $\theta$ )

**Tabla A.1** Datos y resultados para carragenano semirrefinado,  $\kappa/\iota$ - y  $\theta$ -carragenano según diseño experimental.<sup>25</sup>

EXTRACCIÓN DE $\kappa/\iota$ - Y $\theta$ -CARRAGENANO DE LA <i>Catenella impudica</i>													
Prueba	$W_i$ (g)	$W_f$ (g)	$W_{semi.}$ (g)	Rend. (%)	*Rend. (%)	$W_{\kappa/\iota}$ (g)	Rend. $\kappa/\iota$ - (%)	*Rend. $\kappa/\iota$ - (%)	**Rend. $\kappa/\iota$ - (%)	$W_\theta$ (g)	Rend. $\theta$ - (%)	*Rend. $\theta$ - (%)	**Rend. $\theta$ - (%)
1	3,0020	2,9403	1,0029	33,4088	34,1099	0,2838	9,4537	9,6521	28,2970	0,3784	12,6060	12,8706	37,7327
2	3,0027	2,9422	1,2386	41,2484	42,0961	0,1873	6,2377	6,3659	15,1223	0,3585	11,9404	12,1858	28,9474
3	3,0024	2,9155	1,3961	46,4984	47,8843	0,1058	3,5227	3,6277	7,5760	0,2027	6,7513	6,9525	14,5194
4	3,0025	2,9087	1,0961	36,5062	37,6839	0,1686	5,6142	5,7953	15,3788	0,1663	5,5376	5,7163	15,1689
5	3,0025	2,7995	0,7189	23,9445	25,6805	0,1406	4,6828	5,0223	19,5568	0,1032	3,4360	3,6851	14,3500
6	3,0023	2,6455	0,9304	30,9907	35,1704	0,2840	9,4594	10,7352	30,5234	0,1909	6,3585	7,2160	20,5173
7	3,0024	2,8785	1,2178	40,5598	42,3056	0,3081	10,2629	10,7046	25,3032	0,2497	8,3178	8,6758	20,5075
8	3,0024	2,8518	1,2451	41,4702	43,6607	0,1165	3,8802	4,0852	9,3567	0,2324	7,7394	8,1482	18,6625
9	3,0016	2,9724	1,4488	48,2676	48,7423	0,0446	1,4859	1,5005	3,0784	0,2428	8,0890	8,1686	16,7587
10	3,0025	2,7652	1,1593	38,6123	41,9258	0,1315	4,3786	4,7543	11,3399	0,2531	8,4308	9,1543	21,8344
11	3,0025	2,8297	1,0160	33,8385	35,9053	0,0821	2,7333	2,9002	8,0774	0,2058	6,8532	7,2718	20,2526
12	3,0024	2,9833	0,9131	30,4134	30,6078	0,2593	8,6364	8,6916	28,3967	0,1004	3,3451	3,3665	10,9988
13	3,0022	2,7509	1,3937	46,4215	50,6628	0,1707	5,6858	6,2053	12,2483	0,2914	9,7062	10,5930	20,9089
14	3,0019	2,9775	0,9585	31,9287	32,1900	0,1925	6,4115	6,4640	20,0807	0,1757	5,8541	5,9020	18,3348
15	3,0017	2,9766	0,3839	12,7883	12,8963	0,1845	6,1476	6,1995	48,0722	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
16	3,0010	2,6598	1,2764	42,5336	47,9892	0,1248	4,1586	4,6920	9,7772	0,3117	10,3865	11,7188	24,4196
17	3,0022	2,6597	1,2504	41,6495	47,0128	0,1670	5,5637	6,2802	13,3584	0,1779	5,9257	6,6887	14,2274
18	3,0027	2,7994	1,2668	42,1898	45,2537	0,1807	6,0190	6,4561	14,2665	0,2940	9,7901	10,5011	23,2048

Donde, W denota peso, siendo  $W_i$ : De la muestra inicial (después de limpieza);  $W_f$ : De la muestra inicial con secado extra a 60°C;  $W_{semi.}$ : Del carragenano semirrefinado; Rend., \*Rend., y \*\*Rend.: Rendimientos en base a  $W_i$ ,  $W_f$ , y  $W_{semi.}$ , respectivamente.  $\kappa/\iota$ - y  $\theta$ - del tipo de carragenano.

**ANEXO B.** Contraste de significancia para carragenano semirrefinado por %KOH

**Tabla B.1** ANOVA para carragenano semirrefinado por porcentaje de KOH (%).

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>crit</sub></b>
Entre grupos	397,286	4	99,3214	1,10	3,18
Intra grupos	1173,0	13	90,2305		
Total (Corr.)	1570,28	17			

(Statgraphic, 2007)

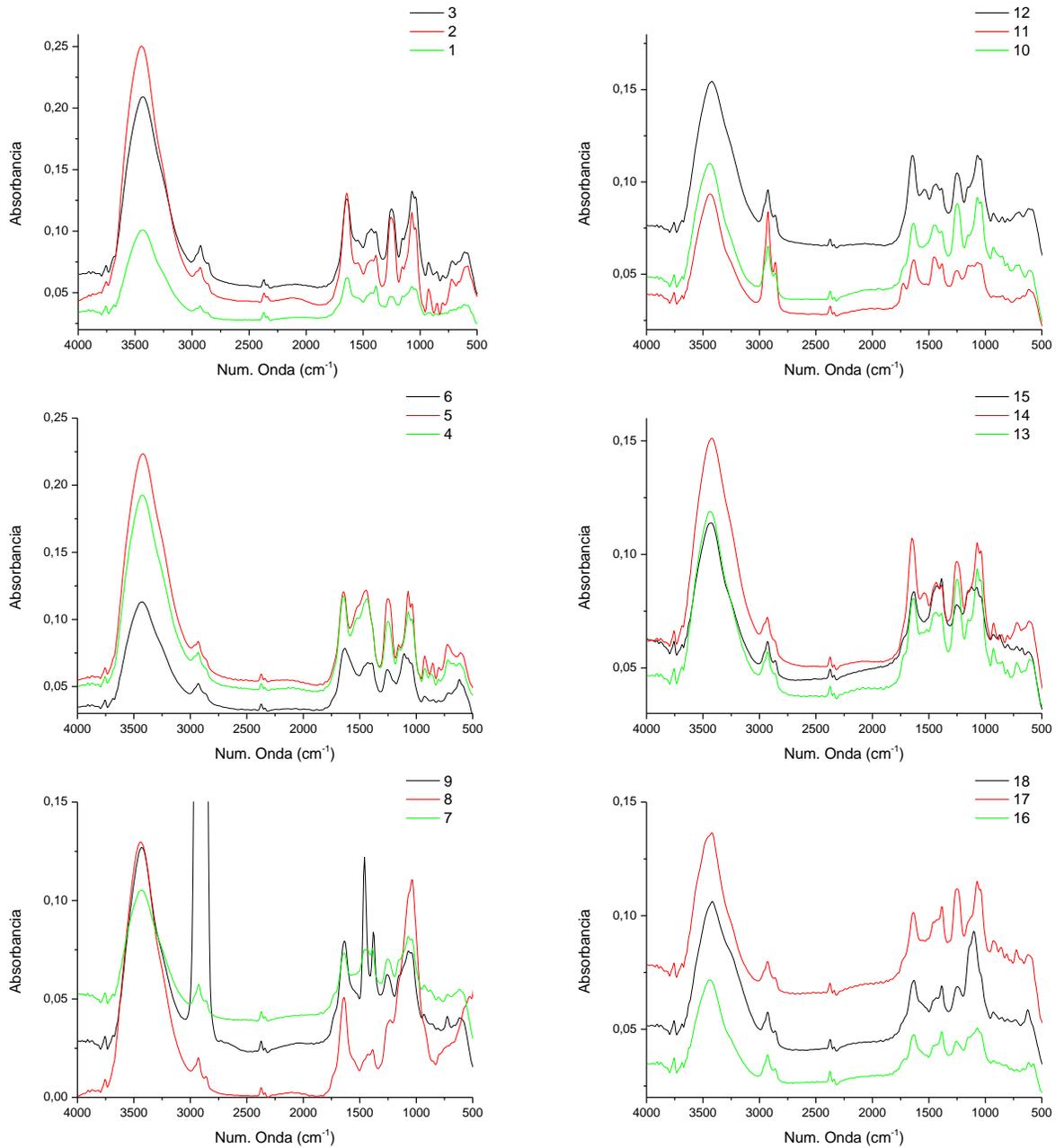
Donde, Gl: Grados de libertad; F<sub>calc</sub>: Valor calculado de F; F<sub>crit</sub>: Valor de F crítica (teórica).

$H_0$ : Las medias muestrales son iguales. Como F<sub>crit</sub> es mayor que F<sub>calc</sub> entonces no se rechaza la hipótesis nula:

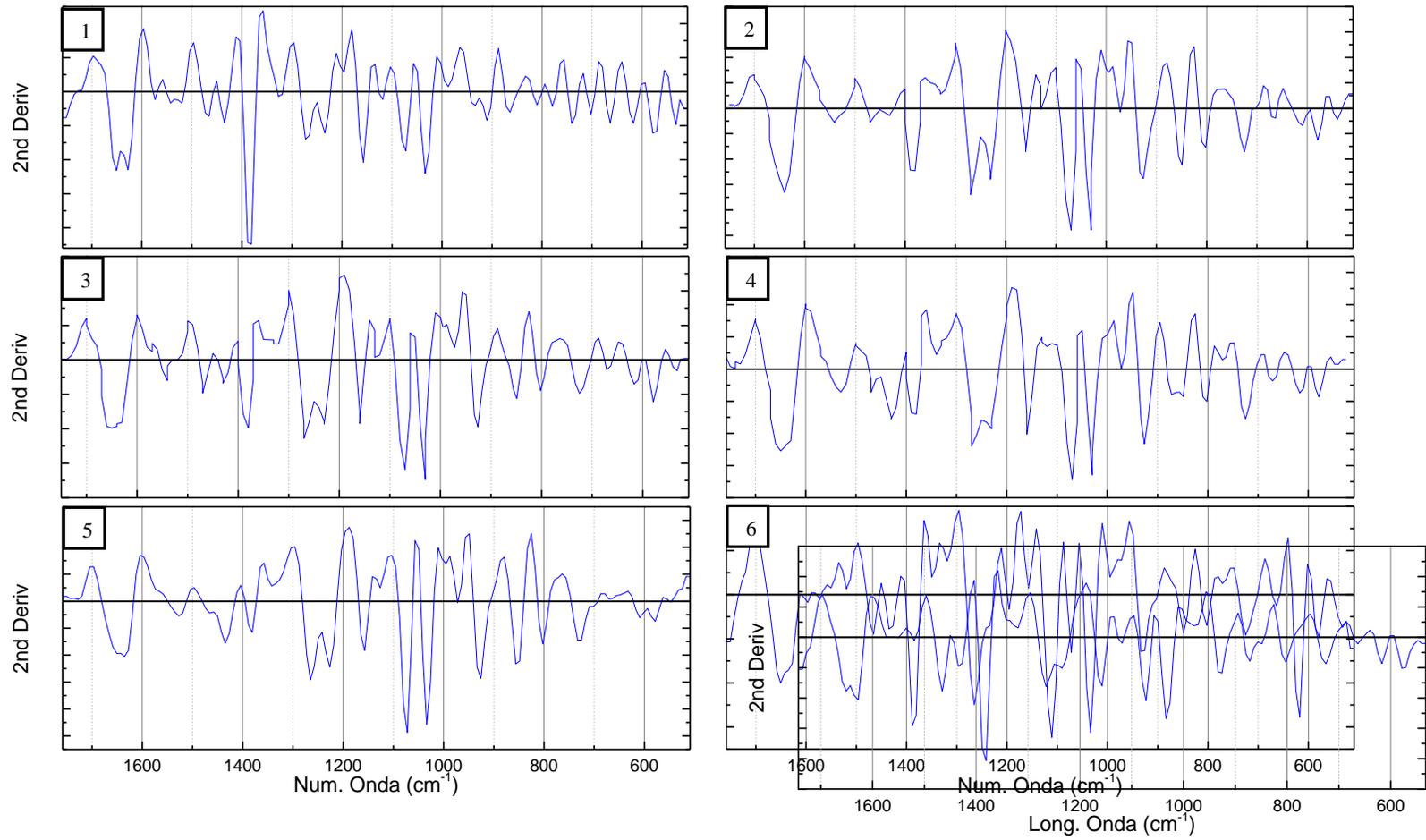
Las medias muestrales no presentan diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

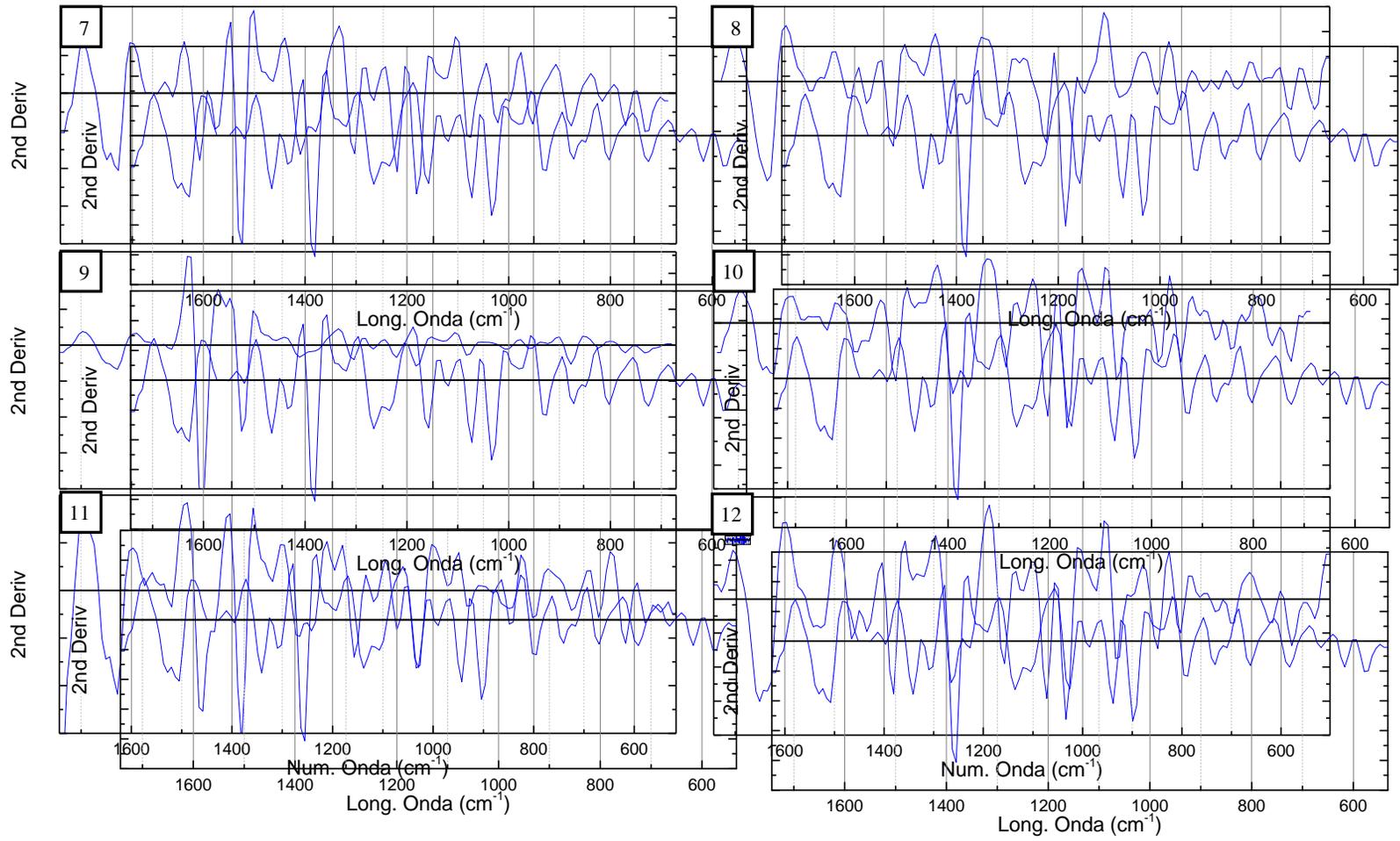
## ANEXO C. Caracterización del carragenano por espectroscopía infrarroja y segunda derivada

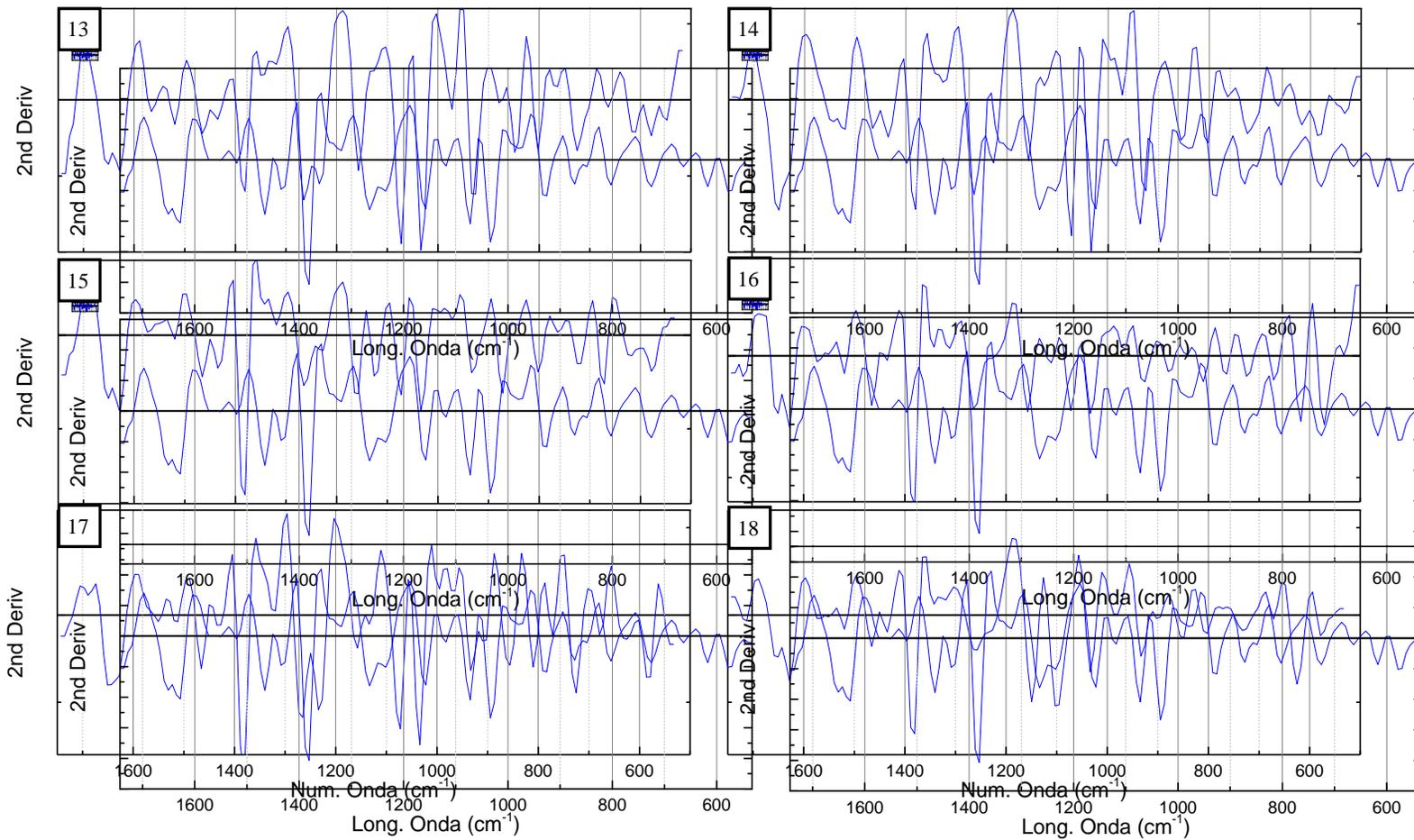
Figura C.1 Espectros infrarrojos de  $\kappa/\lambda$ -carragenano, para las 18 pruebas realizadas.



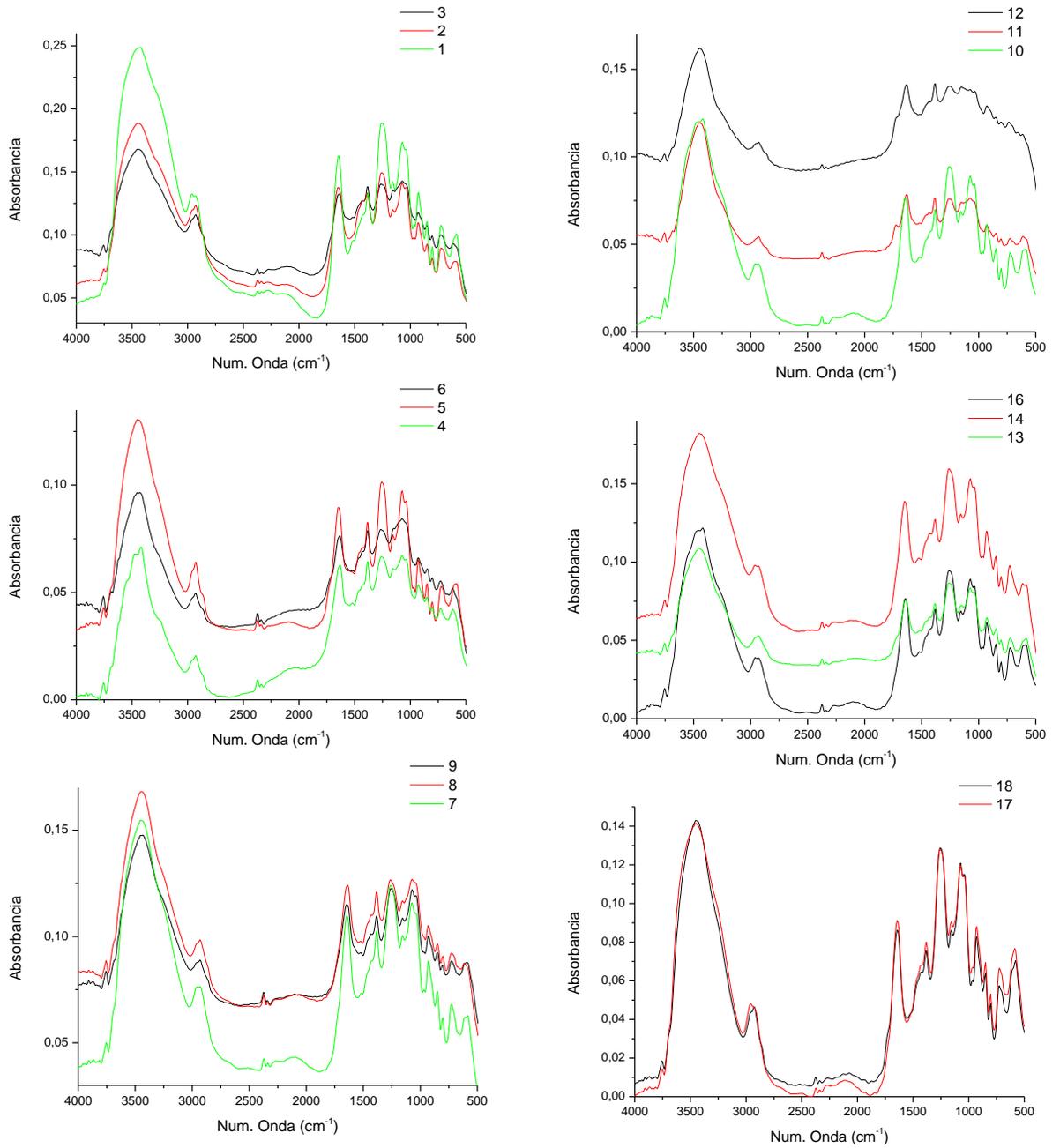
**Figura C.2** Derivada segunda de la región comprendida entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$  de los espectros de  $\kappa/\iota$ -carragenano.



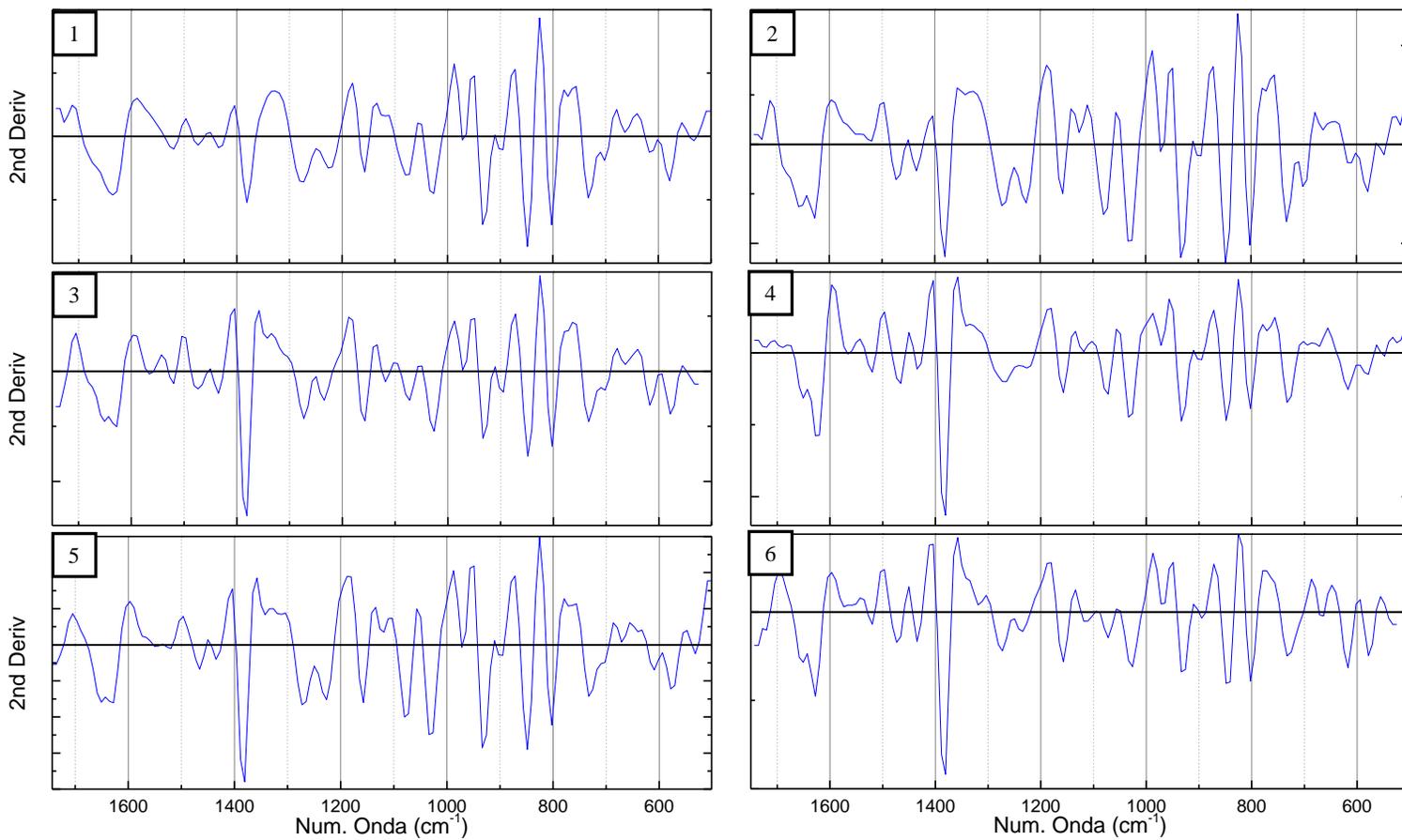


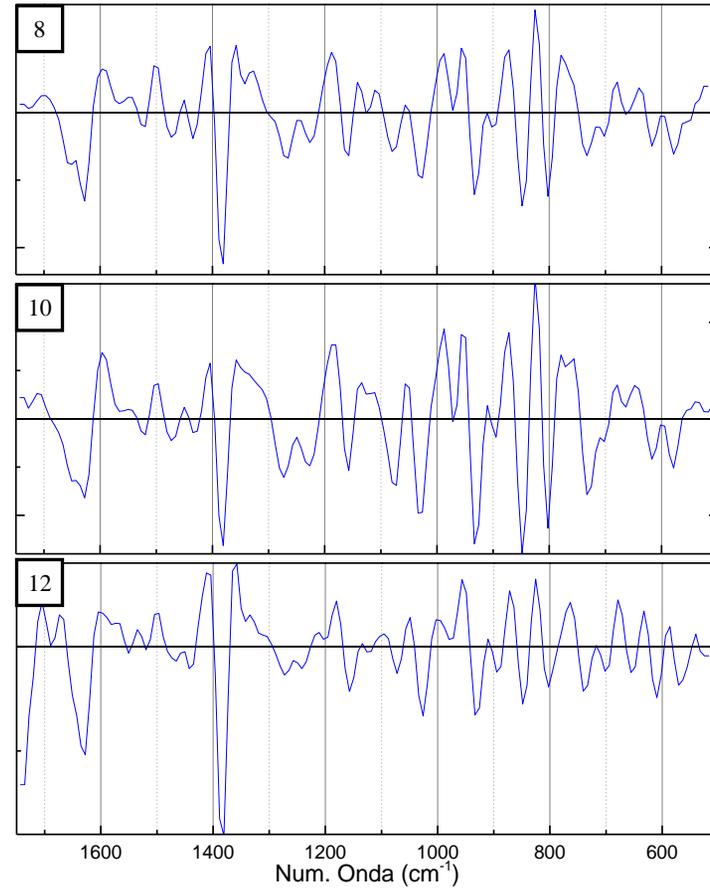
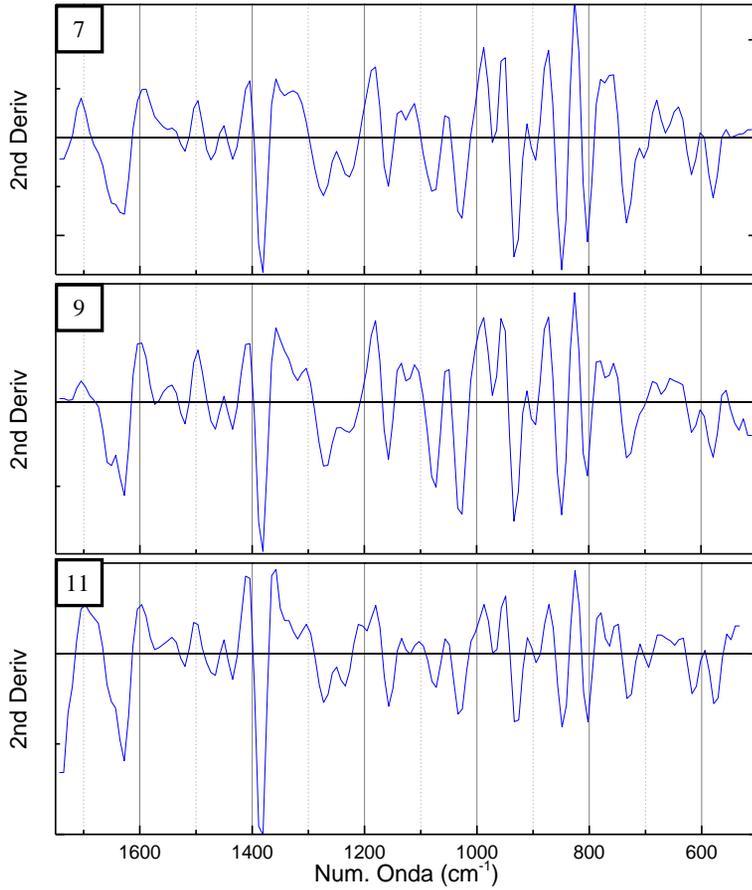


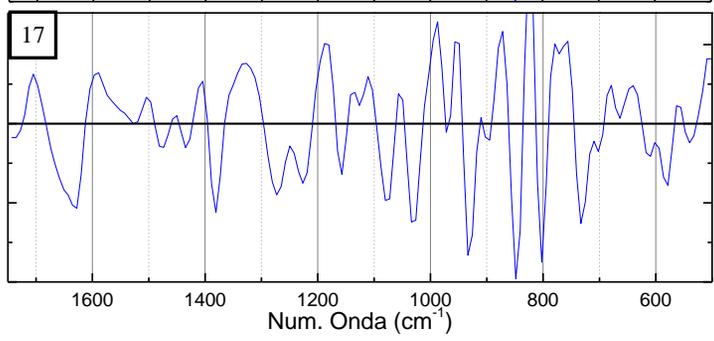
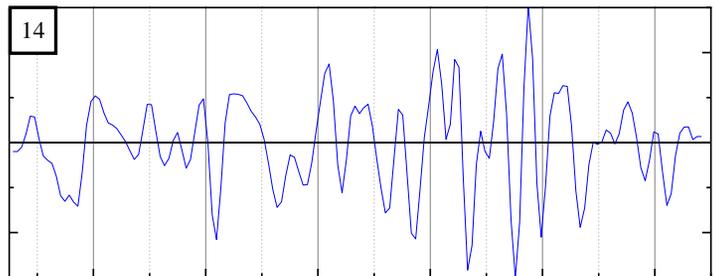
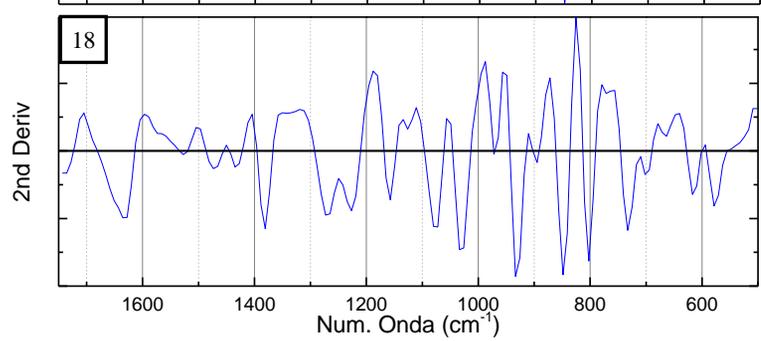
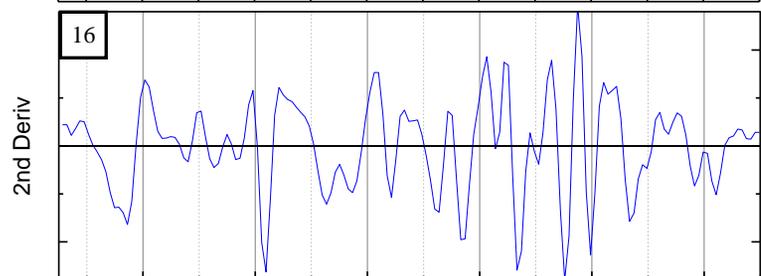
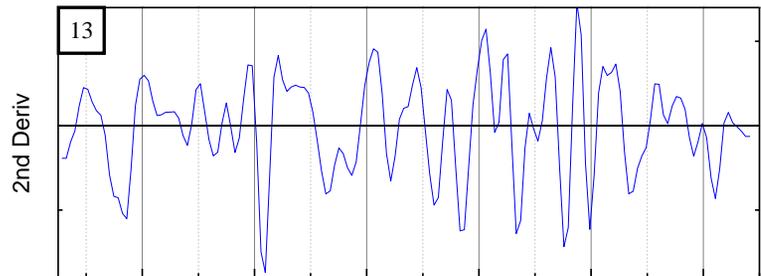
**Figura C.3** Espectros infrarrojos de  $\theta$ -carragenano, para las 18 pruebas realizadas.



**Figura C.4** Derivada segunda de la región comprendida entre 1750-500 $\text{cm}^{-1}$  de los espectros de  $\theta$ -carragenano.







ANEXO D. Certificado de participación en el 43<sup>rd</sup> IUPAC World Chemistry Congress en  
calidad de poster

