

# EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA MICROBIOLÓGICA DEL AGAR EXTRAÍDO DE *GRACILARIA FORTISSIMA* DAWSON (RHODOPHYTA, GIGARTINALES, GRACILARIA-CEAE)

M.V. Sánchez<sup>1</sup> y Ramón Corella<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional, Heredia-Costa Rica. E-mail mvs100@costarricense.cr

<sup>2</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional, Heredia-Costa Rica.

## RESUMEN

Ala especie de alga marina *Gracilaria fortissima* Dawson, recolectada en el Parque Nacional Cahuita, Limón, Costa Rica, se le realizaron los siguientes procedimientos: un análisis de oligoelementos que presentó los siguientes resultados: Cu (5 ppm), Zn (5 ppm), Mn (9 ppm), Ca (100 ppm) y Mg (116 ppm). Se efectuó una extracción de agar utilizando dos métodos A y B. Al agar extraído se le realizaron los siguientes análisis con sus respectivos resultados. Con el método A se obtuvo un pH (7.00), % de extracción (45.20), punto de gelificación ( $33\pm 2$  °C), punto de fusión ( $63\pm 1$  °C) y una resistencia del gel de ( $21\pm 2$  g/cm<sup>2</sup>). Con el método B, un pH (8.10), % de extracción (50.00), punto de gelificación ( $28.8\pm 2$  °C), punto de fusión ( $49\pm 1$  °C) y una resistencia del gel de ( $7.8\pm 0.9$  g/cm<sup>2</sup>). La pureza del agar extraído se comprobó con el espectro infrarrojo y mediante la preparación de medios de cultivo con la bacteria *Erwinia* sp y el microhongo *Pestalotia* sp. Todos los análisis fueron comparados con un agar comercial marca BDH Chemicals.

**Palabras claves:** *Gracilaria fortissima* Dawson, oligoelementos, pH del gel, extracción de agar, punto de gelificación, punto de fusión, espectro infrarrojo, pruebas microbiológicas.

## ABSTRACT

The red seaweed *Gracilaria fortissima* collected in the caribbean coast of Costa Rica, was studied for the

extraction, identification and microbiological performance of the agar content of this plant, as well as the mineral content. The research was done focused on the agar quality included pH, % extraction, gelling point, fusion point and gel strength, as well as infrared analysis and the performance as a microbiological culture of bacteria and fungus and compared with commercial agar from BDH chemicals.

**Keywords:** *Gracilaria fortissima* Dawson, pH gelling, extraction of the agar, gelling point, fusion point.

## INTRODUCCIÓN

La importancia cada vez mayor de los productos obtenidos de las algas obliga a un mayor conocimiento de éstas, mediante trabajos e investigaciones tanto en el mar como en el laboratorio (Álvarez *et al.*, 1978; Segreda, 1987).

El estudio de las algas marinas adquiere cada vez mayor importancia en las investigaciones químico-industriales, debido a que estas plantas constituyen una de las mayores reservas de productos, de muy variado uso en distintos aspectos de la industria moderna (Díaz-Piferrer, 1961; León *et al.*, 1984).

La extracción de ficocoloides es el uso más

importante que se hace en la actualidad de las algas, ya que su utilización como fertilizante y en la alimentación animal y humana es poco practicada (Charpentier, 1980). Entre estos ficocoloides está el agar. La leyenda cuenta que el agar fue descubierto accidentalmente por un mesonero japonés (dueño de un mesón), que había recolectado cierta cantidad de algas rojas para su alimento, pero que al macerarse una parte de éstas las arrojó al patio, donde expuestas durante la noche al intenso frío invernal, amanecieron congeladas en un sólido bloque, el cual al descongelarse con el calor del sol, quedó convertido en una masa blanda y blancuzca. El mesonero encontró que esa gelatina expuesta al calor solar y al aire, al deshidratarse formaba una lámina que debidamente seca, podía guardarse de manera indefinida para luego usarla en la preparación de sus comidas. Su descubrimiento condujo al establecimiento de la primera industria de agar de la historia, allá por 1769 (Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez, 1964).

El agar es una mezcla formada por dos polisacáridos de agarosa y agarpectina (Percival y McDowell, 1967; Zojic, 1970; Nadín, 1979; León, 1984; Friedlander, 1981). Además, es un producto importante en múltiples aspectos de la industria moderna como en la biomedicina, farmacología e industrias de alimentos (Charpentier, 1980; León, 1984; Segreda, 1987; Bird y Hinson, 1992). Su nombre es de origen malayo (Díaz-Piferrer, 1961); es extraído de la pared de la membrana celular de muchas especies de algas rojas (Wieme, 1965; Richmond y Preiss, 1980).

En el presente estudio, se realizó un análisis de oligoelementos en *Gracilaria fortissima* Dawson, se probaron dos métodos para la extracción de agar, se determinaron algunas de las características físicas del agar, se realizó la medición del espectro infrarrojo y se hicieron pruebas microbiológicas para evaluar su calidad y por ende su importancia económica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La especie de alga marina utilizada fue *Gracilaria fortissima* Dawson. Esta alga pertenece a la división Rodófitas, orden Gigartinales, familia Gracilariaceae. Son plantas arbustivas de

un pequeño disco basal, carnosas y de ramificación irregular (Taylor, 1972). Su color varía de rosado a rojo púrpura. Los cistocarpos están distribuidos por todo el talo del alga e inmersos en él, de forma globosa y presentes durante casi todo el año.

La recolección de las algas se realizó en el mes de febrero, cerca de la desembocadura del río Juárez, en el Parque Nacional Cahuita, Limón, Costa Rica (9°44'16"N, 82°50'26"O). Se dejaron escurrir del agua de sal en el sitio de colecta a temperatura ambiente, y luego fueron trasladadas en bolsas plásticas al laboratorio. Fueron colectadas en aguas poco profundas (un metro) sobre una plataforma coralina.

Una vez en el laboratorio, se limpiaron de restos de otras especies y se procedió a realizar la desalinización, la cual consistió en eliminar mediante disolución, la sal (cloruro de sodio, NaCl) que tenían las algas, dejándolas remojar en agua dulce en constante recirculación, durante un período de 12 horas.

Después del proceso de desalinización, se procedió a la decoloración de las algas. Este proceso se realizó colocando las algas en bolsas plásticas transparentes, cerradas herméticamente y colocadas en un lugar donde los rayos del sol las iluminara, hasta su decoloración.

Una vez decoloradas, se colocaron sobre bandejas de aluminio para que se secaran completamente, iluminadas por el sol. Estando secas, se molieron en un molino General Electric a un tamaño de partícula de 0.1 cm<sup>2</sup> y se almacenaron en frascos plásticos para los análisis posteriores, que se detallan a continuación:

1. Se realizó un análisis de oligoelementos: Cobre (Cu); Zinc (Zn); Manganeso (Mn); Calcio (Ca) y Magnesio (Mg), mediante la utilización de un espectrofotómetro de absorción atómica Skimadzu AA-640-13.
2. Se realizaron dos extracciones de agar usando dos métodos, A (esquema 1) y B, respectivamente.

El método B difiere del método A, porque se utilizan 5 g de diatomita pulverizada durante

**Esquema 1**  
**Método A, utilizado para extraer agar de**  
***Gracilaria fortissima* Dawson.**

1. Primera extracción

- 1.1. Pesar 25 g de alga seca y molida, colocarlos en un beaker de 1 000 ml (mililitros).
- 1.2. Adicionar 800 ml de solución de acetato de sodio (0.5 M) acidulada con ácido acético glacial a pH 7.0.
- 1.3. Calentar entre 90-95 °C por una hr (hora).
- 1.4. Dejar enfriar a 50-60 °C y mantener esa temperatura durante tres horas.
- 1.5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 1.6. Centrifugar a 3 000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 min (minutos), en una centrífuga IEC-Centra-7.
- 1.7. Colocar el sobrenadante en bolsas plásticas con cierre.
- 1.8. Congelar a -30 °C durante 10 hr o más.

2. Segunda extracción

- 2.1. Colocar el precipitado de la primera extracción en un beaker de 1 000 ml.
- 2.2. Agregar 500 ml de solución acidulada con ácido acético glacial a pH 7.0.
- 2.3. Calentar entre 90-95 °C por una hr.
- 2.4. Dejar enfriar a 50-60 °C.
- 2.5. Centrifugar a 3 000 rpm por 10 min en una centrífuga IEC-Centra-7.
- 2.6. Colocar el sobrenadante en bolsas plásticas con cierre.
- 2.7. Congelar a -30 °C durante 10 hr o más.
- 2.8. Mezclar los geles congelados a -30 °C de la primera y segunda extracciones, y dejar que se descongelen a temperatura ambiente.
- 2.9. Calentar el gel residual durante 15 min y luego vaciarlo en dos volúmenes de alcohol etílico 95%, durante 4 hr.
- 2.10. Decantar el alcohol etílico residual.
- 2.11. Mezclar el gel con 250 ml de acetona y dejarlo en reposo por 10 hr o más.
- 2.12. Decantar la acetona residual.
- 2.13. Lavar el gel con 250 ml de éter etílico y dejarlo reposar por 10 hr o más.
- 2.14. Extender el gel sobre un recipiente metálico y dejarlo a temperatura ambiente durante 10 hr o más.

la primera extracción, adicionados después del paso 1.3. El resto del procedimiento se realiza de la misma manera, como se muestra en el esquema 1.

Con el agar obtenido en ambas extracciones, se procedió a medir las siguientes características físicas:

- *PH*: utilizando una solución de agar extraído al 3% y medido con un Phmetro Coleman 28C.
- *Porcentaje de extracción*: peso de alga seca molida (g) / peso de agar extraído (g) X 100.
- *Punto de gelificación*: se midió de acuerdo con Díaz-Piferrer (1964) con algunas modificaciones. La medición se realizó de la siguiente manera: se llenó con solución de agar un tubo de ensayo de 1.50 cm de diámetro por 15.50 cm de largo, dejando un espacio de aire de 1 ml aproximadamente. Se tapó con un tapón de goma atravesado por un termómetro con escala de -10 a 100 °C. Se colocó la solución de agarosa solidificada dentro de un baño de agua caliente hasta fundir completamente la solución. Se sacó el tubo del baño y se vertió hacia arriba y hacia abajo, hasta que la burbuja de aire contenida dentro permaneció inmóvil. Se mantuvo en esas condiciones a temperatura ambiente por 20 min para verificar la inmovilización de la burbuja, correspondiente al punto de gelificación de la solución.
- *Punto de fusión*: para su medición se utilizó el mismo tubo de ensayo empleado para medir el punto de gelificación, con la solución de agarosa solidificada, dejando la burbuja de aire aproximadamente hacia el centro del tubo. Se colocó el tubo en un baño de agua caliente calentándose de manera gradual y con agitación constante, hasta la altura en que se encuentra la solución de agarosa solidificada. El punto de fusión corresponde a la lectura que marca el termómetro en el momento en que comienza a desprenderse el gel de la parte superior de la burbuja de aire, que quedó al gelificarse el gel.
- *Resistencia del gel*: la resistencia del gel fue medida con un penetrómetro Instrón

modelo 1 000. La pesa utilizada fue de 5 kg (kilogramos) / cm<sup>2</sup> (centímetro cuadrado), una velocidad de 20 mm (milímetros) / min en un rango de uno en cinco.

- *Espectro infrarrojo*: para determinar la pureza del agar extraído, se midió el espectro infrarrojo (Perkin-elmer 727B).

Para los agares extraídos, las mediciones se realizaron utilizando soluciones al 3% y para el control soluciones de agar a 1.5%, todas por duplicado.

Además, el agar extraído fue utilizado para preparación de medios microbiológicos cultivando la bacteria *Erwinia* sp y el microhongo *Pestalotia* sp.

## RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos con el análisis del contenido mineral de oligoelementos del Cobre (Cu), Zinc (Zn), Manganeso (Mn), Calcio (Ca) y Magnesio (Mg) en ppm (partes por millón), realizado en *G. fortissima* Dawson.

Con la utilización del método A (sin diatomita) y el método B (con diatomita), se extrajo una sustancia gelificante que al ser deshidratada y secada en un horno, para realizar los análisis posteriores, mostró la siguiente apariencia física: la extraída con el método A presentó una apariencia de color cristalina blancuzca y la extraída con el método B, un color pardo oscuro.

Para determinar la pureza de la sustancia gelificante extraída de *G. fortissima* y verificar si era agar u otro tipo de polímero orgánico como el

carragenano, se hizo un análisis con el espectrofotómetro infrarrojo, tanto al agar extraído con los métodos A y B, como al agar comercial utilizado como patrón (BDH Chemicals).

En el cuadro 2, se presentan los resultados obtenidos con respecto a las características físicas del agar extraído de *G. fortissima* con los métodos de extracción A y B, comparados con el agar patrón.

Una vez que se determinó por medio del espectro infrarrojo que la sustancia gelificante extraída de *G. fortissima* correspondía al agar, se procedió a realizar pruebas microbiológicas para verificar que se puede utilizar para tales efectos.

Para las pruebas microbiológicas se utilizaron la bacteria *Erwinia* sp y el microhongo *Pestalotia* sp. Tanto el hongo como la bacteria fueron purificados en medios de cultivo sólidos preparados con agar comercial, antes de ser utilizados en medios de cultivo preparados con los agares extraídos y el empleado como patrón.

Una vez que la bacteria y el hongo se encontraban purificados se procedió a inocular por duplicado los medios de cultivo preparados. Para los cultivos de *Erwinia* sp y *Pestalotia* sp, se prepararon por duplicado placas con el siguiente medio de cultivo conocido como papa-dextrosa-agar (P.D.A.). Preparación por litro: 18 g de agar, 20 g de dextrosa, 500 ml de extracto de papa (200 g/l), 500 ml de agua destilada.

Los medios preparados para el cultivo de *Pestalotia* sp fueron acidificados con ácido láctico al 25% para impedir el crecimiento de bacterias indeseables.

Los resultados obtenidos con los medios preparados con el agar extraído de *G. fortissima* con los métodos A y B fueron muy satisfactorios comparados con los medios de cultivo preparados con el agar patrón. El contenido de agar en los medios de cultivo preparados con el agar extraído utilizando los métodos A y B fue al 3%, con respecto a los medios de cultivo preparados con el agar patrón que fueron al 1.5%.

**Cuadro 1. Contenido mineral de *G. fortissima* Dawson, en ppm de materia seca.**

Cobre (Cu) ppm	Zinc (Zn) ppm	Manganeso (Mn) ppm	Calcio (Ca) ppm	Magnesio (Mg) ppm
5	5	9	100	116

## DISCUSIÓN

**Cuadro 2. Características físicas del agar extraído de *G. fortissima* Dawson, utilizando los métodos A y B, comparados con un agar comercial marca BDH Chemicals como patrón.**

Características físicas	Agar al 3%	Agar al 3%	Agar al 1.5%
	Método A	Método B	Patrón BDH Chemicals
PH $\pm$ 0.05	7.00	8.10	7.10
% de extracción	45.20	50.00	-
Punto de gelificación promedio ( $^{\circ}$ C $\pm$ Desv.)	33 $\pm$ 2	28.8 $\pm$ 0.4	30.3 $\pm$ 0.4
Punto de fusión promedio ( $^{\circ}$ C $\pm$ Desv.)	63 $\pm$ 1	49 $\pm$ 1	63 $\pm$ 2
Resistencia del gel promedio (g/cm <sup>2</sup> $\pm$ Desv.)	21 $\pm$ 2	7.8 $\pm$ 0.9	745 $\pm$ 23

Existen muchas especies de algas marinas de las cuales se puede extraer agar y realizar estudios que permitan obtener información importante como un potencial de fuente alimenticia. La mayoría de estas especies pertenecen a la división Rodófitas, donde pueden ser localizadas taxonómicamente en varias familias, con una gran variedad de representantes.

El análisis del contenido mineral en *G. fortissima* Dawson es de gran importancia informativa como posible fuente de alimentación para el consumo humano y elaboración de alimentos para animales. En la especie estudiada, el contenido mineral fue: Cu (5 ppm), Zn (5 ppm), Mn (9 ppm), Ca (100 ppm) y Mg (116 ppm) (cuadro 1). En el cuadro 3, se presentan los resultados obtenidos en el contenido mineral realizado a *G. fortissima* y

otras especies del mismo género. Según Phillips (1977), ninguno de los elementos alcanza niveles que puedan ser tóxicos para el consumo humano y animal, lo que hace que la especie estudiada, sea ideal para ser utilizada en la preparación de alimentos.

El agar es una sustancia seca, amorfa, gelatinosa y no nitrogenada que es insoluble en agua fría, pero soluble en agua caliente (Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez, 1964). Todas las especies del género *Gracilaria* sp forman geles de muy buena calidad, siendo éstas la gran mayoría de las especies agarófitas (Segreda Rodríguez, 1987).

Para la extracción de agar, existe una gran cantidad de métodos, en los cuales hay unos más complejos que otros. Los métodos A (esquema 1) y B, utilizados en esta investigación, son muy

**Cuadro 3. Comparación del contenido de oligoelementos en algunas especies del género *Gracilaria* sp.**

Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Ca ppm	Mg ppm	Especie	Referencia
0.07	0.01	0.06	1.22	2.15	<i>G. debilis</i>	Díaz-Piferrer, 1979.
0.07	0.01	0.02	4.20	4.80	<i>G. domingensis</i>	Díaz-Piferrer, 1979.
2.81*	13.46*	67.87*	24*	36*	<i>G. fortissima</i>	Charpentier, 1980.
1.81**	15.32**	84.84**	29**	29**		

sencillos. El rendimiento obtenido utilizando los métodos A y B fue del 45.20% y 50.00%, respectivamente (cuadro 2). En el cuadro 4, se muestran los resultados en cuanto al rendimiento obtenido en otras especies de algas del género *Gracilaria*, que han sido reportadas.

Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez (1964), utilizando algas decoloradas como en nuestro

menor que con aquéllos en los cuales no se les ha dado un tratamiento antes de proceder a la extracción del agar. Sin embargo, el agar extraído de la especie en estudio, sin el uso de un tratamiento previo, mostró un rendimiento considerable, según los resultados del cuadro 4.

Una manera para determinar la pureza del agar es mediante la obtención de un espectro con el

**Cuadro 4. Comparación en el rendimiento obtenido de diferentes especies del género *Gracilaria* sp, según autores.**

Especie de alga	Rendimiento	Referencia
<i>G. mammilaria</i>	32.1%	Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez (1964).
<i>G. debilis</i>	82.9% y 83.3%	Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez (1964).
<i>G. curtissiae</i>	73.3%	Díaz-Piferrer y Caballer de Pérez (1964).
<i>G. bursapastoria</i>	16.3% y 19.6%	Hoyle (1978).
<i>G. verrucosa</i>	14%	Whyte y Englar (1980).
<i>G. bursapastoria</i>	31.94%	Santos y Doty (1983).
<i>G. canaliculata</i>	31.07%	Santos y Doty (1983).

caso, extrajeron el agar con una solución de pH 5 en frío y luego a pH 5.5 en caliente. Hoyle (1978) no indica el pH al cual fue extraído el agar. Whyte y Englar (1980) trataron a la especie a la cual se le iba a extraer agar con una solución que contenía NaOH, proporcionando un pH alcalino. Por otro lado, Santos y Doty (1983) extrajeron el agar de las especies de *Gracilaria* con una solución que tenía un pH de 5. En nuestro caso, los métodos (A y B) empleados fueron llevados a cabo utilizando una solución preparada con acetato de sodio (0.5 M) acidulado con ácido acético a pH 7.

El pH de la solución utilizado en el proceso de extracción es uno de los factores importantes que afecta directamente el rendimiento. Sin embargo, otros factores que pueden haber influenciado con respecto al rendimiento de la especie estudiada por nosotros y las otras especies del género *Gracilaria* reportadas pueden ser: la temperatura de extracción, la especie de alga, su estado reproductivo, el lugar donde fue recolectada, el procedimiento metodológico para extracción, entre otros.

Para León et al. (1984), el agar extraído sin tratamiento previo al agar produce un rendimiento

infrarrojo. Con este espectro, se puede determinar si lo que se extrajo de *G. fortissima*, es realmente agar o corresponde a otro tipo de polímero orgánico. En los Cuadros 1 y 2, se encuentran los espectros obtenidos del agar extraído con los métodos A y B

utilizados en esta investigación, comparados con el agar comercial empleado como patrón y donde se pudo determinar realmente que lo extraído corresponde al polímero agar.

Corella y Amato (1981) y García *et al.* (1988) citan los enlaces del espectro infrarrojo que diferencian el agar de los carragenanos, otro polímero gelificante que se extrae de otras especies de algas rojas. Así, el enlace a 1240-1250  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza los polisacáridos sulfatados; el pico de 930-940  $\text{cm}^{-1}$  caracteriza la unión C – O en la 3-6 anhidrogalactosa y el pico a 900  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a los grupos  $-\text{SO}_3\text{H}$ . La ausencia de los enlaces 845-850  $\text{cm}^{-1}$  (sulfato axial secundario en galactosa 4 sulfato con enlace polimérico 1,3) y 805-810  $\text{cm}^{-1}$  (3-6 anhidrogalactosa 2 sulfato) permitió diferenciar de los carragenanos.

Es muy conocido, que el agar es un producto gelificante que puede ser utilizado en múltiples usos en el ámbito industrial, como en pastelería, farmacología, en la preparación de helados, quesos, en cirugía, entre otros. Por otro lado, es muy utilizado en microbiología para la preparación de

medios de cultivo, cuya función es la de mantener en suspensión y de manera homogénea, el medio nutritivo adicionado al agar.

Con el agar extraído de *G. fortissima*, se prepararon medios de cultivo microbiológico. Los medios preparados fueron inoculados individualmente y por duplicado con la bacteria *Erwinia* sp y el microhongo *Pestalotia* sp. La bacteria se extrajo de la zanahoria y es causante de la podredumbre acuosa en esta raíz. La bacteria fue purificada en agar bacteriológico, antes de ser utilizada con los medios de cultivo preparados con el agar extraído con los métodos A y B. Los medios preparados para inocular *Pestalotia* sp fueron acidulados con ácido láctico al 25%, para impedir que las bacterias se desarrollaran.

Los resultados obtenidos con ambas inoculaciones utilizando el agar extraído con los métodos A y B fueron muy satisfactorios, ambos comparados con inoculaciones realizadas empleando el agar BDH Chemicals como patrón.

El hecho de que el agar pueda o no servir en la preparación de medios de cultivo microbiológico puede deberse, en gran parte, al pH inicial de la solución utilizada para la extracción y a los solventes empleados para la deshidratación y purificación del gel. En nuestro caso, el pH del agar extraído con el método A fue de 7.00 y con el método B de 8.10 (Cuadro 2), este último diferente con el agar usado como patrón. Para la preparación de los medios se utilizó del agar extraído con los métodos A y B, una concentración al doble (3%) al del agar comercial (1.5%), para darle una consistencia firme, ya que la resistencia era menor al agar comercial. Sin embargo, a pesar de la diferencia obtenida, los microorganismos inoculados se desarrollaron muy bien.

## LITERATURA CONSULTADA

- Álvarez, A.; M. Caloca; R. Gancedo; M. C. Mosquera y J. M. Salinas. 1978. Estudios sobre algas industrializables en España. Parte I. "Contribución al conocimiento de la estructura microscópica de los filoides fértiles de *Gelidium sesquipedale* (Clem) Born et thur". *Bol. del Inst. Esp. de Ocean.* Tomo 4, 250 (2): 113-116.
- Bird, K. T. and T. K. Hinson. 1992. "Seasonal variations in agar yield and quality from North Carolina agarophytes". *Bot. Mar.* 35: 291-295.
- Charpentier, C. 1980. *Variaciones estacionales en la composición química de cinco algas de la costa Caribe de Costa Rica y su posible utilización.* Tesis Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. 76 pp.
- Corella, R. y S. Amato. 1981. Extracción e identificación de agar de *Gracilaria fortissima* Dawson. Congreso Latinoamericano de Química para el Desarrollo. Memoria. San José, Costa Rica. 426i-426iii p.
- Díaz-Piferrer, M. 1961. *Taxonomía, ecología y valor nutricional de algas marinas cubanas.* III- Algas productoras de agar. Mem. Inst. Cubano Invest. Tecnol. (17): 84 p.
- Díaz-Piferrer, M. y C. Caballer de Pérez. 1964. *Taxonomía, ecología y valor nutricional de algas marinas de Puerto Rico.* I Algas productoras de agar. Instituto de Biología Marina, C.A.A.M. Universidad de Puerto Rico. 10-126.
- Friedlander, M.; Y. Lipkin and W. Yaphe. 1981. "Composition of agars from *Gracilaria cf verrucosa* and *Pterocladia capillacea*". *Bot. Mar.* 24: 595-598.
- García Pineiro, R.; J. Gonzales Lavaut y L. Fernández. 1988. "Caracterización estructural del agar obtenido a partir del alga roja *Briothamnion triquetrum*". *Rev. Cubana Farm.* 22(2): 100-110.
- Hoyle, M. D. 1978. "Agar studies in two *Gracilaria* species (*G. bursapastoris* Gmelin Silva and *G. coronopifolia* J. Ag.) from Hawaii". 11 Seasonal Aspects. *Bot. Mar.* 21(6): 347-352.
- León, D.; I. Peña; J. Avendaño y J. J. Alvarado. 1984. "Producción de agar-agar en Costa Rica a partir de *Gracilaria fortissima*". *Rev. Cost. Cienc. Med.* 5(2): 144-149.
- Nadín, A. O. 1979. "Estudio de la composición química de una especie agarífera del litoral argentino, *Ahmfeltia plicata* (Huds) fries (Rhodophyta)". *Inst. Nac. de Tecn. Ind.* (33): 8-26.
- Percival, E. and R. H. McDowell. 1967. *Chemistry and enzy-*

- mology of marine algal polysaccharides*. Academic Press. England. 219 pp.
- Phillips, E. W. 1977. "Trace elements". *Veterinary pharmacology and therapeutics*. Ed. por Jones, L. M.; N. M. Booth y L. E. McDonald. 4ª. edición. The Iowa State University Press. 1380 pp.
- Richmond, A. and K. Preiss. 1980. "The biotechnology of algaculture". *Interdisciplinary science reviews*. 5(1): 60-70.
- Santos, G. A. and M. S. Doty. 1983. "Agar from some Hawaiian red algae". *Aquat. Bot.* 16: 385-389.
- Segreda Rodríguez, A. C. 1987. *Obtención de agar a partir de un alga roja del género Gracilaria*. Tesis Escuela de Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica. 70 pp.
- Taylor, A. R. A. 1972. "A basis for continuing assessment of natural and exploited populations of *Chondrus crispus* Stackh". IN: *Proceedings of the seventh international seaweed symposium*. Ed. for Nisizawa, K. University of Tokyo Press. Japan. 7: 263-268.
- Whyte, J. N. C. and J. R. Englar. 1980. "Chemical composition and quality of agars in the morphotypes of *Gracilaria*