



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,  
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

# **EXTRACCIÓN DE AGAROSA DESDE EL ALGA ROJA *GRACILARIA CHILENSIS* UTILIZANDO POLIETILENGLICOL**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN  
BIOTECNOLOGÍA

MARÍA FRANCISCA TRUJILLO PALLANTE

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
CAROLINA CAMUS TORRES  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por:  
Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB. Fondo FB0001

SANTIAGO DE CHILE  
2024

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL  
TÍTULO DE:** Ingeniera Civil en Biotecnología  
**ESTUDIANTE:** María Francisca Trujillo Pallante  
**FECHA:** 2024  
**PROFESOR GUÍA:** María Elena Lienqueo Contreras

## **EXTRACCIÓN DE AGAROSA DESDE EL ALGA ROJA *GRACILARIA CHILENSIS* UTILIZANDO POLIETILENGLICOL**

La grave crisis climática actual, muestra la urgencia de movernos hacia procesos productivos sustentables, como los de biorrefinería, que utilizan recursos renovables, para producir energía y biocombustible. La biorrefinería de algas ha captado la atención debido a las múltiples ventajas que presenta este tipo de biomasa, tal como su rápido crecimiento en el océano, mientras capta CO<sub>2</sub>.

En Chile, el cultivo comercial de algas se limita al alga roja conocida como pelillo (*Gracilaria chilensis*), que es utilizada para la producción de agar, polisacárido constituyente de su pared celular altamente utilizado por sus propiedades gelificantes. Estas provienen de uno de sus constituyentes, la agarosa, que es un polisacárido neutro, cuya composición depende del tipo de alga de la cual se extrae, los métodos y condiciones de operación utilizados. Su calidad depende de la pureza alcanzada, la que se asocia con el contenido de sulfatos y la fuerza de gel.

Buscando contribuir al desarrollo de la biorrefinería, este trabajo consiste en implementar un proceso de extracción de agarosa por precipitación con polietilenglicol, desde agar previamente extraído de biomasa de pelillo. Se extraerá a cuatro temperaturas 50, 60, 70 y 80°C, para luego caracterizar los productos obtenidos, y determinar la temperatura que entrega una agarosa de mayor calidad, comparable a productos comerciales.

Se implementó el proceso y se obtuvieron los productos deseados, los cuales fueron caracterizados, sin embargo, las extracciones de agarosa se realizaron desde diferentes lotes de agar, los cuales mostraron diferencias significativas en sus características, lo que impidió analizar el efecto de la temperatura en el proceso. Al comparar los agares y agarosas se encontraron diferencias significativas entre estos, principalmente en contenido de sulfatos, lo que indica que la extracción fue exitosa. El mayor rendimiento de extracción de agarosa se obtuvo a 50°C, mientras que el menor fue a 80°C. El contenido de sulfato en las agarosas varió entre un  $0,16 \pm 0,02\%$  y un  $0,20 \pm 0,04\%$ , lo cual está dentro de lo reportado para productos comerciales. Las temperaturas de gelificación entre agarosas no mostraron diferencias significativas, estando en un rango de 29 a 31°C, similar a la agarosa comercial. Las temperaturas de fusión se encontraron entre 77 y 79°C, menores que la agarosa comercial. La agarosa extraída a 50°C muestra la mayor fuerza de gel medida, 642 g/cm<sup>2</sup> y un mejor rendimiento en electroforesis. Por lo que se concluye que esta última corresponde a la agarosa de mejor calidad obtenida, pudiendo ser un producto comercialmente atractivo.

La investigación realizada ratifica este proceso como una metodología efectiva para la extracción de agarosa desde un amplio rango de calidad de agar y nos entrega una caracterización de las agarosas obtenidas desde *Gracilaria chilensis*. Se obtuvieron agarosas de buena calidad, comparables con productos ya comercializados, por lo que muestra ser un proceso prometedor para ser implementado en una biorrefinería de esta alga importante comercialmente para Chile.

*Este trabajo está dedicado a mi familia, quienes han sido mi  
inspiración, motivación y apoyo incondicional.  
Los amo.*

***Saludos***

# Agradecimientos

Gracias a la vida y a la gratuidad por la oportunidad de estudiar en esta universidad. Gracias a mi yo del colegio, que confió en sus capacidades para cumplir con este gran desafío y por su valentía de dejar Coquimbo para venir a Santiago a estudiar biotecnología. Gracias a mi yo de la universidad que no se rindió nunca y que cuando llegó a especialidad supo que tomó la decisión correcta.

Gracias, mamá y papá, por apoyarme, siempre confiar en mí y por darme la oportunidad de construir mi camino, aun estando lejos de ustedes. Gracias por todo su amor y preocupación, por acompañarme y sostenerme durante toda mi vida, los amo. Gracias abuelita, mi mamamama, me diste un hogar acá en Santiago durante estos 7 años, donde tenía todo lo que necesitaba y más, te preocupaste y ocupaste de mí siempre. Gracias por enseñarme, con tu trabajo, esfuerzo y dedicación, lo que es ser una mujer fuerte. Gracias mi Fer, tía Dani y Emi, por ser quienes son y por su amor incondicional. Gracias Thomy, mi amor, por todo lo que hemos crecido juntos y por estar siempre a mi lado. Gracias a mis amigas y amigos, que son lo más lindo que me dio la u, por su compañía y apoyo, por todas las tardes juntos y las risas. Espero que lean esto y sepan lo agradecida que estoy de tenerlos en mi vida. De aquí en adelante buscare siempre la forma de retribuir todo el amor que me han entregado, y que me ha hecho llegar donde estoy, este logro también es gracias a ustedes.

Gracias también a los profesores del departamento y de la facultad en general, que compartieron sus conocimientos y experiencia conmigo. Gracias a los profesores de los cursos que tome de cambio climático y sustentabilidad, por el importante rol que cumplen de concientizar y fomentar la acción sustentable en la ingeniería. Ellos me abrieron los ojos y me mostraron la urgencia de que haya un cambio de perspectiva, que es necesaria la acción individual, pero sobre todo interdisciplinaria, para proteger y hacer próspero nuestro futuro en este planeta.

En particular, gracias profesora Maria Elena, por proponer y permitirme formar parte de su investigación en biorrefinería de algas, las cuales me interesaron después de cursar su ramo de “Energías Renovables a partir de Biomasa”, ya que, en él pude conocer una forma concreta en la que la ingeniería podía contribuir a este desarrollo sustentable del que tanto había escuchado y tener la primera oportunidad de contribuir como ingeniera y comenzar mi desarrollo profesional en esta área, de verdad le agradezco haber podido desarrollar este trabajo bajo su guía.

Muchas gracias, Diana, fuiste fundamental para mi trabajo de memoria por tu apoyo y guía en todo momento, tanto en el laboratorio como fuera de este. Me enseñaste todo lo que necesitaba y más para completar este trabajo. Te agradezco de todo corazón, por tu amabilidad y disposición, fuiste una bendición en este proceso tan importante en mi vida.

Gracias a todas las personas del CeBiB, por la linda comunidad que forman y por su buena onda. Gracias también a Gloria Troncoso por realizar los análisis mediante FTIR y al profesor Fernando Osorio de la Usach, por concederme su tiempo y facilitar el equipo de medición de fuerza de gel, ambos resultados fueron fundamentales para completar todo el trabajo realizado.

# Tabla de Contenido

Capítulo 1 : Introducción.....	1
1.1. Contexto.....	1
1.2. Biorrefinerías .....	1
1.3. Biorrefinería algal .....	2
1.4. Algas y sus usos .....	3
1.5. Motivación y descripción del proyecto.....	6
1.6. Objetivos .....	6
Capítulo 2 : Marco Teórico .....	7
2.1. Agar .....	7
2.1.1. Métodos de extracción.....	8
2.1.2. Agar de <i>Gracilaria chilensis</i> .....	9
2.2. Agarosa .....	10
2.2.1. Determinación de la calidad .....	11
2.2.1. Métodos de extracción.....	13
2.2.2. Precipitación con polietilenglicol .....	14
2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier .....	16
2.3.1. Análisis de composición química .....	17
Capítulo 3 : Metodología .....	18
3.1. Extracción de Agar .....	18
3.2. Extracción de Agarosa .....	18
3.3. Caracterización productos.....	20
3.3.1. Medición contenido de sulfatos.....	20
3.3.2. Análisis FTIR.....	21
3.3.3. Temperatura de fusión.....	21
3.3.4. Temperatura de gelificación.....	22
3.3.5. Propiedades reológicas.....	22
3.3.6. Fuerza de gel .....	22
3.3.7. Idoneidad para electroforesis.....	23
3.3.8. Análisis estadístico .....	24

Capítulo 4 : Resultados y Discusiones .....	25
4.1. Extracción de agar .....	25
4.2. Extracción de agarosa .....	26
4.2.1. Rendimiento extracción de agarosa .....	28
4.3. Caracterización de polisacáridos .....	29
4.3.1. Apariencia .....	29
4.3.1. Contenido de sulfato.....	30
4.3.2. Espectrofotometría FTIR.....	32
4.3.1. Temperatura de gelificación.....	35
4.3.2. Temperatura de fusión.....	36
4.3.3. Fuerza de gel .....	38
4.3.4. Idoneidad para electroforesis.....	39
4.3.5. Resumen de la caracterización de agarosas extraídas a diferentes temperaturas .....	40
Capítulo 5 : Conclusiones .....	42
5.1. Recomendaciones .....	44
Bibliografía.....	45
Anexo A : Materiales y equipos.....	49
A.1. Extracción de agar.....	49
A.2. Extracción de agarosa .....	49
A.3. Caracterización propiedades fisicoquímicas .....	50
Anexo B : Base de datos resultados .....	53
Anexo C : Cálculo rendimiento agarosa .....	54
Anexo D : Contenido de sulfato.....	55
D.1. Curva de calibración .....	55
D.2. Porcentaje de sulfato .....	56
Anexo E : Resultados FTIR .....	57
E.1. Porcentajes similitud compuestos librerías .....	57
E.2. Comparación espectros FTIR agar y agarosas .....	58
Anexo F : Resultados temperatura de gelificación y fusión .....	60
Anexo G : Cálculo fuerza de gel .....	61

# Índice de Tablas

Tabla 1: Características productos agarosa presentes en el catálogo de la empresa Sigma Aldrich [32] y un producto de Fermento Biotec, producido en Chile (*)[33].....	12
Tabla 2: Resumen resultados caracterización agarosas extraídas mediante precipitación con PEG desde agar de <i>G. chilensis</i> . Se incluyen datos medidos para agarosa comercial SeaKem® LE Agarosa de Lonza y datos de catálogo para la Agarosa Lafken LM, de Fermento Biotec [33]. .....	41
Tabla 3: Masa de agarosa obtenida en la extracción a 50°C, realizada en triplicado.....	54
Tabla 4: Datos curva de calibración contenido de sulfatos. ....	55
Tabla 5: Porcentajes similitud muestras de agar de <i>G. chilensis</i> y agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas, con compuestos de las librerías FTIR. Se indica entre corchetes el numero identificador del compuesto. ....	57
Tabla 6: Temperaturas de gelificación y fusión promedio de los geles de agar extraído de <i>A. chilensis</i> y las agarosas obtenidas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas. Geles formados con una concentración de 1,5% p/v.....	60
Tabla 7: Datos de fuerza máxima obtenidos en la medición de la fuerza de gel para la agarosa extraída a 50°C. ....	61

# Índice de Figuras

Figura 1: Esquema simplificado del proceso productivo de una biorrefinería algal [3].	2
Figura 2: Alga roja <i>Gracilaria chilensis</i> .	4
Figura 3: Estructura química componentes principales del agar, agarosa y agarpectina [21].	7
Figura 4: Estructura química agarosa, con sus dímeros agarobiosa y neoagarobiosa [29].	10
Figura 5: Mecanismo de gelificación moléculas de agar y agarosa [31].	11
Figura 6: Esquema resumen de las metodologías experimentales. [Elaboración propia]	18
Figura 7: Diagrama de flujo proceso de extracción de agar desde biomasa de algas.	18
Figura 8: Diagrama de flujo proceso de extracción de agarosa mediante precipitación con PEG.	18
Figura 9: Muestra de <i>G. chilensis</i> seca.	25
Figura 11: Gel de agar obtenido con la incorporación de la etapa de centrifugación.	25
Figura 10: Gel de agar con impurezas.	25
Figura 13: Agar secado en estufa.	26
Figura 12: Agar liofilizado.	26
Figura 14: Pellet agarosa extraída a 50°C, con 3 capas visibles.	26
Figura 15: Prueba con Lugol para detectar trazas de PEG,	27
Figura 16: Pellet agarosa	27
Figura 17: Pellet agarosa extraída a 70°C.	27
Figura 18: Gráfico rendimiento extracción de agarosa mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas. (n=3)	28
Figura 19: Resultados análisis estadístico para el rendimiento extracción de agarosas. Mayor número de * representan una mayor diferencia significativa.	28
Figura 20: Agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas.	29
Figura 21: Geles de agarosa (1.5%) extraídas a diferentes temperaturas.	29
Figura 22: Geles de agar de <i>Agarophyton chilensis</i> y geles de agarosa extraídas a diferentes temperaturas por el método de precipitación con PEG (1,5% p/v).	30
Figura 23: Gráfico contenido de sulfato agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas,	30
Figura 24: Resultados análisis estadístico ANOVA para el contenido de sulfatos de agares (a)	y31
Figura 25: Gráfico de los porcentajes de similitud de los agares y agarosas extraídas con los compuestos disponibles en la librería FTIR.	32



Figura 26: Espectros resultantes del análisis mediante FTIR para los agares extraídos de <i>G. chilensis</i> . .....	33
Figura 27: Espectros resultantes del análisis mediante FTIR para las agarosas extraídos mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas. Se incluye espectro de agarosa comercial. ....	34
Figura 28: Espectros FTIR de la agarosa extraída a 50°C mediante precipitación con PEG.....	34
Figura 29: Gráfico temperatura de gelificación promedio de las agarosas extraídas mediante precipitación con PEG y sus respectivos agares. (n=4 para agarosas) (n=2 para agares) .....	35
Figura 30: Resultados análisis estadístico ANOVA para la temperatura de gelificación de agares (a) y agarosas (b). El rótulo ns significa que no existen diferencias significativas.....	36
Figura 31: Gráfico temperaturas de fusión promedio para las agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas y sus respectivos agares. (n=4 para agarosas) (n=2 para agares) .....	37
Figura 32: Resultados análisis estadístico ANOVA para la temperatura de fusión de sulfatos de	37
Figura 33: Gráfico resultados fuerza de gel para agarosas extraídas mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas. Se incluyen mediciones de agar y agarosa comercial. (n=3) .....	38
Figura 34: Resultados análisis estadístico ANOVA para agarosas extraídas a diferentes temperaturas y agarosa comercial. Mayor número de * representan una mayor diferencia significativa. ....	39
Figura 35: Resultados electroforesis en geles de agarosa extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas, desde agar de <i>G. chilensis</i> .....	40
Figura 36: Curva de calibración contenido de sulfato, realizada con un estándar de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> con concentraciones entre 0,2 mg/ml y 2 mg/ml. ....	55

# Capítulo 1: Introducción

## 1.1. Contexto

Como sociedad enfrentamos grandes desafíos debido al cambio climático, el rápido crecimiento de la población, la escasez de alimentos y la creciente demanda de compuestos bioactivos derivados de la naturaleza en diversos aspectos de la vida. A pesar de décadas de investigación internacional, debate político y advertencias científicas se ha fracasado en la mitigación y reducción de las emisiones de CO<sub>2</sub>, al contrario, estas siguen al alza [1].

El aumento de la temperatura global provocado por los gases de efecto invernadero ha causado importantes daños al medioambiente. Ante esta situación, 197 países, incluido Chile, conformaron el Acuerdo de París, el cual establece planes de acción mundial. Para alcanzar los objetivos estipulados y apoyar el desarrollo sostenible, no basta con reducir el CO<sub>2</sub> liberado, también se debe capturar desde la atmósfera, logrando emisiones netas de carbono cero o negativas, a través de diversas medidas sociales, económicas, medioambientales y tecnológicas [2].

Así, el uso de fuentes de energía renovable debe surgir como sustituto de los combustibles fósiles de manera urgente [3][2]. Entre muchas alternativas, los biocombustibles son una opción atractiva, dado que se obtienen a partir de biomasa y su proceso tiene una gran capacidad de captura y almacenamiento de carbono. Sin embargo, obtener este producto no es rentable económicamente, debido a los altos costos y uso de recursos que requiere el cultivo de la materia prima. Para aumentar la factibilidad, buscando emular las refinerías de petróleo, se crea el concepto de biorrefinería, con etapas de extracción consecutivas, logrando producir diversos productos de alto valor [4].

Problemáticas como el cambio climático, la seguridad del abastecimiento energético y el aumento de los costos de los combustibles fósiles, la producción de biocombustibles para el transporte es el principal motor para el desarrollo de biorrefinerías [5].

## 1.2. Biorrefinerías

Las biorrefinerías forman parte de la economía circular, desde el diseño del proceso productivo se considera el ciclo de vida del producto, buscando la reducción del impacto ambiental, minimizando el consumo de recursos y la generación de residuos [6]. Estas contribuyen al desarrollo sostenible, enfoque que se esfuerza por satisfacer las necesidades humanas de forma económicamente viable, respetuosa con el medioambiente y socialmente beneficiosa [5].

La biorrefinería, es una instalación donde se realiza el procesamiento sustentable de biomasa para generar una amplia variedad de bioproductos (comida, alimento, químicos, materiales) y fuentes de bioenergía (biocombustibles, energía y/o calor), esta cuenta las tecnologías de conversión pertinentes. La obtención de diversos productos logra maximizar el valor asociado a la materia prima

procesada desde una perspectiva no solo económica, sino que también social y medioambiental. Sin embargo, es primordial examinar críticamente las opciones de materias primas, procesos y mezcla de productos para garantizar la sostenibilidad [6][5].

Las biorrefinerías se han diseñado y utilizado recientemente para procesar diversos tipos de biomasa, estas pueden ser de primera, segunda o tercera generación. Las materias primas de primera generación son cultivos alimentarios como el maíz, el trigo y la caña de azúcar. En la actualidad, más del 80% de la producción mundial de biocombustibles es etanol de primera generación. Esto ha provocado una competencia con la producción de alimentos, en el uso de la tierra y en la reducción de la oferta de cultivos alimentarios, aumentando los precios de los alimentos en algunos países [5]. Tampoco disponemos de suficiente tierra fértil y agua dulce para cultivar la cantidad de biomasa necesaria para una producción de biocombustibles que satisfaga la demanda probable y para capturar el carbono que ya se ha liberado a la atmósfera [4]. Por esto, la atención se está desplazando a las materias primas de segunda y tercera generación [5].

Las materias primas de segunda generación son materiales lignocelulósicos e incluyen cultivos energéticos (por ejemplo, álamo y miscanthus) y residuos (por ejemplo, agrícolas, forestales y municipales). Las de tercera generación consisten principalmente en microalgas y algas marinas [5].

### 1.3. Biorrefinería algal

Considerando que los mares y océanos cubren cerca del 70% de la superficie terrestre y contienen 97% del agua del planeta, así como los minerales necesarios para la producción de biomasa, un sistema de biorrefinería basado en el medio y los recursos marinos podría ser una solución práctica y prometedora [4]. La Figura 1, muestra un esquema simplificado de una biorrefinería algal [3].

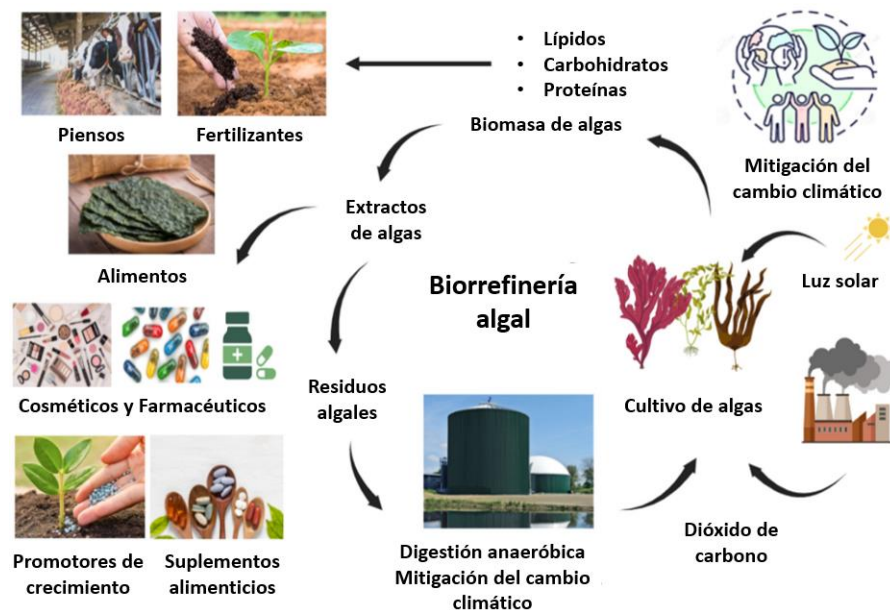


Figura 1: Esquema simplificado del proceso productivo de una biorrefinería algal [3].

Las algas se consideran materia prima de avanzada, tercera generación. Su utilización está ganando atención, ya que tiene muchas ventajas para la producción de bioenergía en comparación con la biomasa lignocelulósica [6]. Estas pueden cultivarse fácilmente con energía solar en el océano, por lo tanto, no compiten por tierras fértiles ni por el agua dulce con el cultivo de alimentos, teniendo un bajo coste energético. Tampoco se necesitan insumos agrícolas como fertilizantes, pesticidas. Están presentes en todo el mundo y tienen una alta disponibilidad. Crecen a tasas muy altas, a la vez que fijan gran cantidad de CO<sub>2</sub>, mediante la fotosíntesis, por lo que es un cultivo es respetuoso con el medio ambiente [7][8]. Otro servicio ambiental para lo que son utilizadas, es la extracción de nitrógeno disuelto, elemento clave en los procesos de eutrofización, y otros contaminantes que afectan a los sistemas costeros [7].

Además, las algas tienen un alto contenido de polisacáridos y lípidos y en la mayoría de los casos no contienen mucha lignina, lo que permite superar la desventaja de la biomasa lignocelulósica, pudiendo convertirse en bioetanol con una elevada tasa de conversión energética, teóricamente superior al 80%. Todo lo anterior demuestra que el uso eficiente de biomasa marina ofrece una solución prometedora a los graves problemas del agotamiento de los combustibles fósiles y el calentamiento global, así como para la seguridad energética, alimentaria e hídrica y un vehículo para la mitigación sostenible del cambio climático [8].

## 1.4. Algas y sus usos

Las algas marinas se utilizan en todo el mundo desde hace siglos, y su cultivo es una actividad milenaria que ha sido desarrollada principalmente en países asiáticos, ya que, se consideraban una fuente de alimento fundamental para las comunidades costeras debido a su alto contenido de macronutrientes [9].

Dadas las propiedades fisicoquímicas y nutricionales de las algas, su utilización se ha diversificado, alcanzado importancia mundial. Son altamente apreciadas al ser la materia prima para producir ficocoloides, polímeros naturales que confieren volumen, textura y viscosidad a una variada gama de productos en la industria cosmética, médica y alimenticia [10]. También se han utilizado como biorremediadores de ambientes afectados por “pasivos ambientales” costeros y otras sustancias potencialmente contaminantes, por ejemplo, nitrógeno y metales pesados [10].

Actualmente unas 221 especies de algas marinas tienen valor comercial y diez de ellas se cultivan intensivamente. La producción mundial está sustentada fundamentalmente por la acuicultura, en 2020 la recolección silvestre fue de 1,1 millones de toneladas, mientras que la producción acuícola abarcó el 97 %, alcanzando los 35,1 millones de toneladas[9][11]. La industria mundial superaba los 6.000 millones de dólares anuales en 2018, alrededor del 85% corresponde a la venta de productos alimentarios para consumo humano, en su mayoría extractos, como carragenina, agar y alginatos, los cuales representan casi el 40% del mercado mundial de hidrocoloides alimentarios; el resto procede de animales, microbios y plantas terrestres [9].

Chile se encuentra entre los principales países productores de algas a nivel mundial, sin embargo, estas provienen principalmente de poblaciones silvestres, siendo uno de los líderes en extracción, junto con China y Noruega [9]. Dado el esfuerzo pesquero ejercido, las praderas naturales han ido perdiendo su capacidad de crecimiento y algunos recursos algales se encuentran con un alto riesgo de sobreexplotación, a esto se suman los efectos ambientales del cambio climático, como variaciones en temperatura, salinidad, oxígeno, pH, entre otros, los cuales han generado un escenario aún más incierto para la productividad de los sistemas marino-costeros, las fuentes de ingreso familiar para los grupos de pescadoras y alquerías que extraen este recurso [10].

Nuestro país es privilegiado para el desarrollo de la acuicultura de recursos con valor comercial, al poseer un extenso borde costero con zonas de alta productividad y buenas características biogeográficas [12]. Estas características han permitido el desarrollo de grandes cultivos de especies de salmónidos (salmón, trucha), moluscos (mejillones, ostra, ostión, abalón), y alga (pelillo), siendo la acuicultura es una de las actividades productivas que más ha crecido en los últimos años.

Chile ha implementado instrumentos que regulan y promueven el desarrollo de la acuicultura de macroalgas a pequeña escala, como la Ley 20.925 publicada el año 2016, un subsidio que beneficia a quienes deseen implementar proyectos de cultivo y repoblamiento. Ofreciendo esta actividad como una alternativa de diversificación productiva y también como una respuesta de adaptación del sector pesquero artesanal al cambio climático [10]. Por lo que, el cultivo de macroalgas representa un sector que además de las condicionantes económicas, presenta una alta importancia en los ámbitos sociales y geopolíticos [12].



Figura 2: Alga roja *Gracilaria chilensis*.

En 2022, este sector productivo representó el 1% del cultivo total del sector acuícola del país. La cosecha acumulada al mes de diciembre 2022 fue de 15.500 ton, donde el alga roja *Gracilaria chilensis* (o *Agarophyton chilensis*), comúnmente conocida como "pelillo", mostrada en la Figura 2, representó el 91,4% de la producción, explotándose principalmente en la región de Los Lagos (87,4%), seguido por la Región de Coquimbo (7,9%). De esta producción, 2.748 ton se exportaron

como alga seca [13]. La mayor parte de la biomasa de pelillo es procesada en el país para producir agar, siendo un importante productor y exportador de este producto [9]. En 2022, se exportaron 1018 toneladas de agar, con ganancias de 26.899 mil dólares [13].

El agar, o agar agar, ha tenido una gran demanda en la mayoría de los países asiáticos como alimento desde hace más de 300 años, este se produce principalmente a partir de algas rojas de la

familia *Gracilaria*, siendo el componente principal de la pared celular [9]. Es un complejo coloidal compuesto principalmente de polisacáridos capaces de gelificar, muy utilizado como agente espesante y gelificante en la industria alimentaria y farmacéutica [14]. Está compuesto principalmente por agarosa, agarosa piruvada y galactanos sulfatados, cuya composición molecular varía según la especie de alga del cual se extrae. El agar de *A. chilensis* es altamente demandado debido a su resistencia a la hidrólisis durante el almacenamiento y su alta reactividad [14].

Sin embargo, en la producción industrial de agar, al igual que en la mayoría de los sistemas de producción actuales, solo se utiliza una fracción limitada de la biomasa para obtener un único producto de interés, desechando el resto lo que resulta en un desperdicio medioambiental y económico [15]. Por esto, es importante proponer la extracción de productos de alto valor añadido, como proteínas y compuestos bioactivos, además del agar.

Se ha evaluado previamente la recuperación simultánea de productos a partir de algas de la especie *A. chilensis*, donde se logró la extracción de ficobiliproteínas y agar, obteniendo productos de buena calidad [14]. Estas proteínas presentan actividad fotosintética y se utilizan como colorantes en alimentación y cosmética, han mostrado valor terapéutico por su actividad inmunomoduladora y anticancerígena. Además, el agar, es un material de exportación muy importante y su calidad depende de la materia prima, métodos de extracción y condiciones de secado [14][16].

Por otro lado, la agarosa es un polímero neutro y esencialmente no iónico que constituye una parte importante del agar. Es un material de alto valor comercial y su demanda ha ido en aumento, especialmente en campos como la biotecnología y la biología molecular [16].

La agarosa es responsable de las propiedades gelificantes del agar y se caracteriza por su neutralidad, al carecer de grupos cargados que puedan interactuar con otras moléculas. Su estructura molecular se compone de largas cadenas de polisacáridos lineales y flexibles, que le confieren la capacidad de formar geles estables en soluciones acuosas. La calidad de la agarosa depende de la materia prima utilizada y los métodos de extracción y está determinada principalmente por la fuerza del gel de agarosa [16].

Se han publicado numerosos estudios sobre la extracción de agarosa desde agar, basados en un principio básico de separación en función de las diferentes cargas iónicas de la agarosa y de la agarpectina [17]. Algunos de los métodos de extracción son la acetilación y la metilación del agar, la extracción mediante precipitación ya sea de la agarosa o de la agarpectina, también mediante cromatografía de intercambio iónico. Algunos de los métodos más actuales incluyen el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) para eliminar la agarpectina y también la extracción basada en líquidos iónicos (IL), que son bio-solventes [17].

En particular la extracción por precipitación de la agarosa con polietilenglicol (PEG), es un proceso clásico, que fue patentado en 1968 para la extracción industrial de agarosa, sin embargo, este debe ser optimizado para cada tipo de alga. Ya que variables como la temperatura y tiempo del proceso, el tipo de PEG y su concentración varían la calidad del producto obtenido [18].

## 1.5. Motivación y descripción del proyecto

Motivados por la necesidad de hacer un aprovechamiento integral de la biomasa de *Gracilaria chilensis*, creemos que es importante contribuir a la diversificación de los productos obtenidos a partir de esta alga, para que formen parte de un proceso factible de biorrefinería. Logrando fomentar el cultivo de esta alga, aumentar su valor y contribuir al desarrollo procesos sustentables en el país, que traen consigo no solo beneficios económicos, sino también sociales y medioambientales.

Por ello, este trabajo se orienta a implementar y mejorar a nivel de laboratorio, una metodología de extracción de agarosa a partir de agar extraído de *G. chilensis*, buscando obtener un material de alta calidad y valor añadido, con potenciales aplicaciones en diversos campos científicos e industriales. La metodología consiste en la extracción de agar desde residuos algales de pelillo, mediante cocción a alta temperatura, con pretratamiento alcalino. Luego, desde el agar, se extrae agarosa, mediante precipitación con polietilenglicol. Se evalúan 4 temperaturas de extracción, 50, 60, 70 y 80°C. Posteriormente, se caracterizan las agarosas obtenidas mediante estudios con espectrofotometría infrarroja, medición del contenido de sulfato, fuerza de gel, temperatura de gelificación y fusión, comparándolas con la caracterización de una agarosa comercial y referencias bibliográficas, adicionalmente, se medirá su idoneidad para electroforesis.

Finalmente se analizan y discuten los resultados para determinar la temperatura óptima la extracción de agarosa para esta especie de alga, que será la que entregue una agarosa con mayor fuerza de gel y tenga una calidad comparable con los productos presentes en el mercado.

## 1.6. Objetivos

Para el desarrollo de este trabajo experimental se plantean los siguientes objetivos:

### **Objetivo general**

Evaluar y mejorar el proceso de extracción de agarosa desde agar de *Gracilaria chilensis*.

### **Objetivos específicos**

- Implementar un proceso que permita extraer agar desde residuos algales de *G. chilensis*.
- Implementar un proceso que permita extraer agarosa desde el agar de *G. chilensis* mediante precipitación con polietilenglicol, evaluando el efecto de la temperatura en la extracción.
- Caracterizar el agar y agarosa obtenidos, midiendo propiedades físicas y químicas relevantes para determinar la calidad de los productos.
- Comparar la calidad de los agares, las agarosas extraídas a las diferentes temperaturas y productos comerciales, observando diferencias en sus propiedades fisicoquímicas, determinando la temperatura óptima de extracción de agarosa, según la que entrega mayor fuerza de gel.

# Capítulo 2: Marco Teórico

## 2.1. Agar

El agar es un carbohidrato complejo, principal constituyente de la pared celular de algas rojas [19]. Este consiste en una mezcla heterogénea de galactanos, polímeros de galactosa, unidos alternativamente por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 y  $\alpha$ -1,3. La hidrólisis completa del agar produce monómeros de azúcares, como D-galactosa, 3,6-anhidro-L-galactosa y L-galactosa-6-sulfato [8].

Los galactanos que componen el agar, difieren en sus conformaciones y en los sustituyentes de sus cadenas laterales, teniendo diferentes densidades de carga. Se pueden encontrar sustituyentes como el éster sulfato, el grupo metoxilo y el ácido pirúvico, los que disminuyen la propiedad gelificante general del agar [20]. Los dos polímeros constituyentes principales del agar son la agarosa y agarpectina, cuya estructura química se puede observar en la Figura 3. La proporción de estos dos polímeros varía de acuerdo con la especie del alga [20].

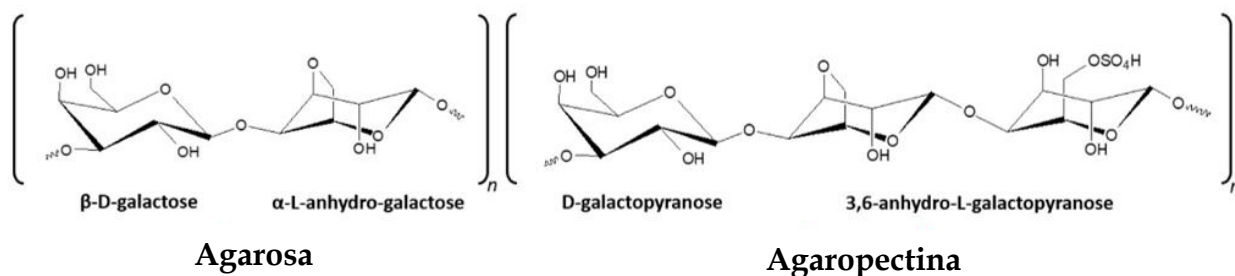


Figura 3: Estructura química componentes principales del agar, agarosa y agarpectina [21].

Agarosa es un nombre comúnmente aceptado que se refiere a polisacáridos neutros con unidades repetidas de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa. Se estima que esta estructura lineal contribuye hasta en un 70% al polisacárido de agar. La agarosa es la responsable de la capacidad gelificante del agar, que es una gelificación en medios acuosos con una reactividad muy baja con cationes y proteínas, lo que diferencia el agar de otros gelificantes [16].

Por otro lado, la agarpectina tiene la misma estructura base que la agarosa, constituida principalmente por unidades alternadas de D-galactosa y L-galactosa, pero esta contiene muchos grupos aniónicos en su estructura como sulfato, piruvato y glucoronato, conteniendo todos los grupos polares existentes en el agar. Aporta propiedades adicionales, como la resistencia a los cambios de temperatura y a los ácidos. Esta posee un bajo poder gelificante en agua [16].

El agar generalmente se presenta como un polvo fino, de color blanco o ligeramente amarillento. Cuando se mezcla con agua caliente y se enfría, adquiere una textura gelatinosa y transparente. La consistencia del gel formado por el agar puede variar según la concentración utilizada y las condiciones de gelificación. Puede ser firme y elástico, similar a la gelatina convencional, o más suave y gelificado, dependiendo de su aplicación y la cantidad de agar utilizado. En forma seca, el agar no tiene olor ni sabor distintivo [16].



Una de las características fundamentales del agar es su elevada histéresis de gelificación, que es la diferencia entre la temperatura de gelificación y de fusión de un gel, siendo la mayor de todos los hidrocoloides. Una vez disuelto el agar en agua, cuando la solución se enfría hasta su temperatura de gelificación, entre 32-43°C, se formará un gel, el cual solo se derretirá cuando se caliente hasta alcanzar su temperatura de fusión, aproximadamente 80-90°C. Esto permite que la solución se solidifique fácilmente a temperatura ambiente y que el gel se pueda calentar, haciéndolo estable hasta temperaturas bastante altas, lo que resulta atractivo para sus distintas aplicaciones [16][21].

Las propiedades y cantidad de agar extraído dependen de muchos factores, como son, la especie de alga, la procedencia de esta, su madurez, parámetros ambientales, temporada de recolección y los métodos de extracción utilizados[22]. La estación del año, el ambiente y las condiciones de cultivo pueden influir en el rendimiento de la producción de agar, mientras que la calidad del agar depende mayormente de los tratamientos y la especie utilizada[16].

El agar es soluble en agua hirviendo pero insoluble a temperaturas más bajas. La propiedad gelificante del agar depende de su composición y grado de sulfatación. En general, el agar con mayor contenido de agarosa y bajo grado de sulfatación puede formar geles mejores y más fuertes. El alto contenido de compuestos sulfurados puede reducir la calidad del agar, característica que presentan principalmente las especies de *Gracilaria*, para la cual se informa un mayor grado de sulfatación, en comparación con los agares de *Gelidium* y *Pterocladia*, principalmente en el C-6 de la L-galactosa que contribuyen a una menor fuerza de gel [20].

En general, los rendimientos de obtención de agar varían entre el 20% y el 35% para la mayoría de las algas utilizadas para su extracción y se ha demostrado que este aumenta cuando el alga es sometida a un pretratamiento alcalino [16][21]. Las aplicaciones del agar se basan principalmente en las características de su gel. Más del 80% del agar producido se consume en la industria alimentaria y el resto se utiliza principalmente en biotecnología y otras aplicaciones científicas. Un agar se considera de buena calidad cuando puede resistir una fuerza entre 400 y 500 g/cm<sup>2</sup>, uno de alta calidad resiste una fuerza mayor a 700 g/cm<sup>2</sup> [16][23].

### 2.1.1. Métodos de extracción

El proceso de extracción de agar se basa en su solubilidad en agua caliente y su insolubilidad en agua fría. Para lograr una alta solubilidad, rendimiento y calidad, durante la extracción es importante controlar los parámetros de temperatura y tiempo de exposición, evitando la fragmentación excesiva del polisacárido. Otra variable que influye en el rendimiento del proceso es la proporción del volumen de agua en el cual se realiza la extracción [24].

Antes de la extracción, las algas se lavan en agua fría para eliminar impurezas y sales, y luego se secan para su almacenamiento. La temperatura de secado influye en el rendimiento, temperaturas más altas pueden aumentar el rendimiento, pero afectar la extracción de otros componentes. Luego estas son fragmentadas para romper sus estructuras celulares y liberar el agar contenido en ellas. Esto facilita la extracción del agar en etapas posteriores del proceso [16][25].

Las algas de los géneros *Gracilaria* y *Gelidium* se utilizan principalmente para la producción comercial de agar. *Gracilaria* se prefiere para la producción de agar de calidad alimentaria, mientras que *Gelidium* se utiliza para la producción de agar y agarosa de calidad farmacéutica. Además, el agar procedente de *Gelidium* es de mejor calidad, con una fuerza de gelificación, gelificación y temperaturas de fusión interesantes, mientras que a partir de *Gracilaria* se obtiene un gel de agar de baja calidad relacionado con su alto contenido en sulfatos [21].

Sin embargo, las propiedades gelificantes de los agares de las especies de *Gracilaria* pueden mejorarse mediante un pretratamiento alcalino para convertir la  $\alpha$ -L-galactosa-6-sulfato en 3,6-anhidro- $\alpha$ -L-galactosa [21]. Sin embargo, es necesario adaptar el tratamiento alcalino a cada tipo de alga para evitar la disolución del agar, buscando la concentración adecuada del medio alcalino y el tiempo de tratamiento [22].

Después del tratamiento se requiere una etapa de neutralización previa a la solubilización, que busca dejar el pH de la solución levemente alcalino o neutro. Una vez neutralizada, la masa de algas molidas se somete a un proceso de extracción con agua caliente. El calor ayuda a disolver el agar presente en las células de las algas, formando una solución acuosa, esta se mantiene a altas temperatura y con agitación durante un tiempo de extracción que permita obtener el mayor rendimiento. Como ya se mencionó, en esta etapa es muy importante controlar los parámetros de temperatura y tiempo de exposición, evitando la fragmentación excesiva del polisacárido [16].

La solución resultante se filtra para eliminar las impurezas y restos de la biomasa de algas. Esto se puede hacer mediante filtración a través de tamices o membranas, lo que deja una solución relativamente clara de agar en agua. La solución filtrada se concentra para aumentar la concentración de agar. También se pueden realizar pasos adicionales de purificación para eliminar cualquier contaminante residual y mejorar la calidad del agar [16].

El agar concentrado y purificado se seca para obtener un polvo fino o láminas sólidas, dependiendo de la forma deseada del producto final. El secado se realiza típicamente mediante métodos como secado al aire, liofilización o secado por pulverización [16].

### 2.1.2. Agar de *Gracilaria chilensis*

Debido a que las características del agar obtenido varían según el alga del que se extrae, se han realizado estudios del agar extraído desde *Gracilaria chilensis*, que entregan datos sobre el rendimiento del proceso y sus propiedades. Se pudo observar que, al aumentar la concentración del pretratamiento alcalino, aumentaba el rendimiento, mientras que la temperatura de gelificación y fusión del agar disminuían. Se seleccionó un pretratamiento con 3% NaOH, con el cual se obtuvieron rendimientos de alrededor un 23%, valores similares a los reportados para otras algas [14]. Reportes anteriores muestran rendimientos mucho mayores, en torno al 40% [26].

Por otro lado, se mostraba que el pretratamiento alcalino disminuía el contenido de sulfato del agar desde un 2.2% hasta un 1.6%. Con esta disminución, las temperaturas de gelificación y fusión aumentaban levemente, estando en un rango entre 36-42°C y 75-81°C respectivamente [26].

Las características físicas y el contenido de sulfato de los agares extraídos con pretratamiento alcalino fueron comparables a las del agar comercial, por lo que consideraron esta especie de alga apta para la producción de agar con fines comerciales, especialmente para la industria alimenticia. Mediante la técnica de cromatografía de intercambio aniónico este estudio determinó que solo el 25% de los agares extraídos corresponden a fracciones neutras [26]. Esto demostró que el agar de esta alga es esencialmente una mezcla de polímeros de agarosa, agarosa piruvada y galactanos sulfatados [27].

## 2.2. Agarosa

La agarosa es una molécula neutra de cadena larga formada por residuos de  $\beta$ -D-galactopiranososa conectados a través de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,3 y  $\beta$ -1,4 con residuos de 3,6-anhidro-L-galactosa, su estructura se puede observar en la Figura 4 [28]. Ambos residuos se repiten alternativamente. Los enlaces entre los monómeros tienen diferente resistencia a la hidrólisis química y enzimática. Los enlaces  $\alpha$ -1,3 son más fácilmente hidrolizados por enzimas y se produce neoagarobiosa. Los enlaces  $\beta$ -1,4 son más fácilmente hidrolizados por catalizadores ácidos y producen unidades de agarobiosa. Estos últimos hacen que la cadena de polisacáridos sea especialmente compacta y resistente a la rotura [16].

El peso molecular asignado a la agarosa no degradada es de aproximadamente 120.000 g/mol. Este peso se ha determinado mediante mediciones de sedimentación y representa 400 unidades de agarobiosa, unidas entre sí. La agarobiosa, puede ser considerada como la unidad de repetición de un polímero de agarosa y tiene un peso molecular aproximado de 306 g/mol [16].

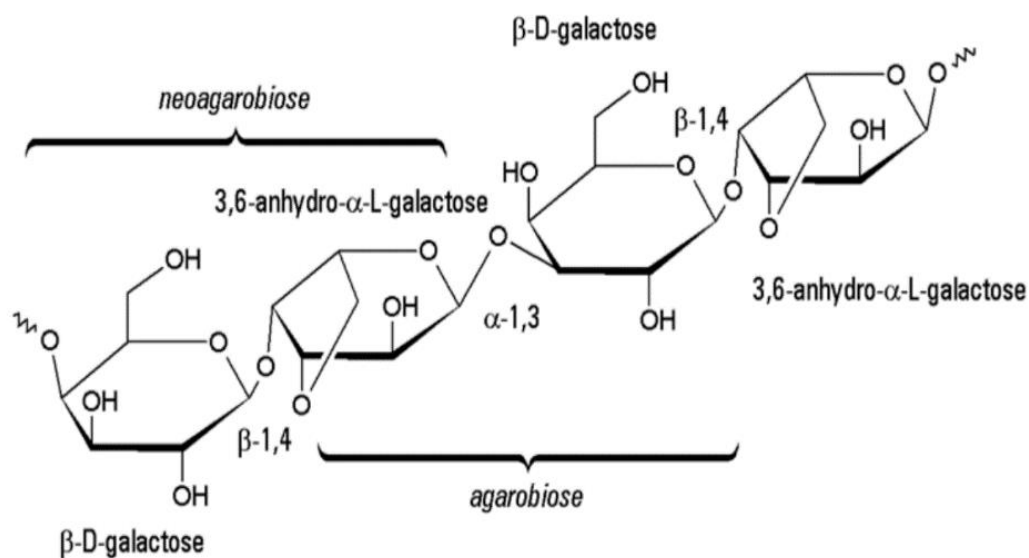


Figura 4: Estructura química agarosa, con sus dímeros agarobiosa y neoagarobiosa [29].

Cada cadena de agarosa contiene aproximadamente 800 moléculas de galactosa, y estas forman fibras helicoidales que se agregan en una estructura superenrollada con un radio de 20-30 nm. Las fibras son casi rígidas y tienen un amplio rango de longitud dependiendo de la concentración de agarosa. Cuando una solución de agarosa se enfría, se solidifican y las fibras forman una malla tridimensional de canales de diámetro que oscila entre 50 nm y >200 nm dependiendo de la concentración de agarosa utilizada; las concentraciones más altas producen diámetros de poro promedio más bajos [29]. La estructura tridimensional se mantiene unida con enlaces de hidrógeno y, por lo tanto, puede romperse calentándola de nuevo, siendo un gel termo reversible. El mecanismo de gelificación, se representa en la Figura 5 [30]

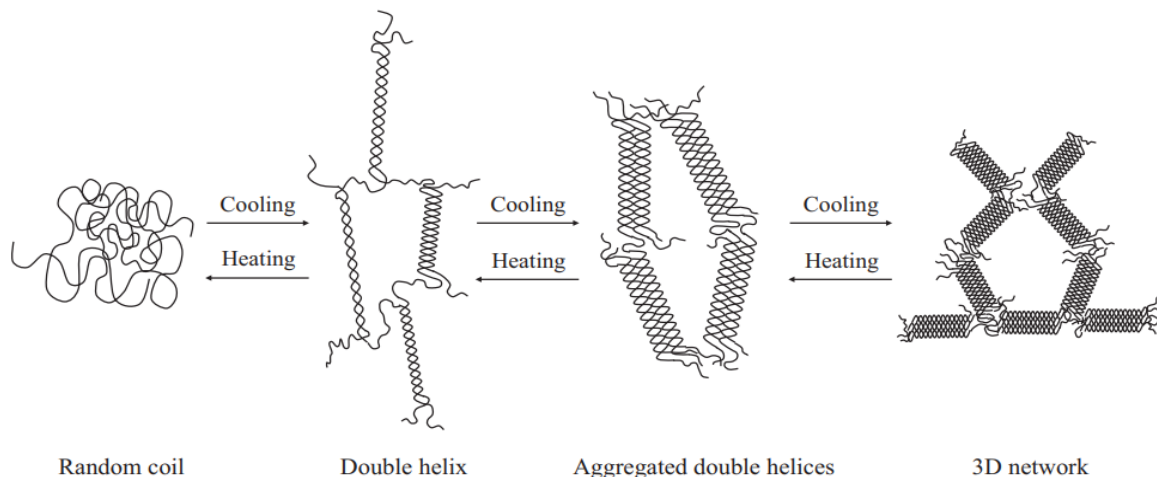


Figura 5: Mecanismo de gelificación moléculas de agar y agarosa [31].

### 2.2.1. Determinación de la calidad

Los criterios para juzgar la calidad de la agarosa son múltiples, entre los cuales se encuentran, su apariencia, propiedades fisicoquímicas, pureza, entre otros. Los valores buscados van a depender de la aplicación a la que se destine. En el caso de las propiedades fisicoquímicas, se considera su color, transparencia en solución, humedad, temperaturas de gelificación y fusión y fuerza de gel, siendo esta última, uno de los parámetros más utilizados [16].

Por otro lado, como criterios de pureza, se busca la reducción de los grupos electronegativos al mínimo, específicamente el contenido de sulfatos y piruvato, ya que la presencia de estos grupos puede generar interacciones no deseadas en las aplicaciones de la agarosa y afecta sus propiedades fisicoquímicas. El aumento de la presencia de estos grupos puede producirse por una mala separación de la agarpectina. La resistencia o fuerza de gel se correlaciona negativamente con el contenido de sulfato porque éste puede aumentar la repulsión mutua entre las moléculas de agar y dificultar la agregación de las dobles hélices, durante la formación del gel, por lo que la estructura tridimensional de la red está relativamente suelta, lo que disminuye la resistencia del gel [31]. Igualmente es muy importante asegurar la ausencia de residuos de reactivos utilizados en el proceso de producción de agarosa [16].

Particularmente se prefiere la agarosa de mayor pureza, para su uso en la electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa, ya que la presencia de los grupos cargados negativamente, crean un flujo de agua en dirección opuesta al movimiento del ADN, en un proceso denominado electroendosmosis, lo que puede retardar el movimiento del ADN y provocar la difuminación de las bandas. También provocan un aumento de la fijación de las sustancias cargadas eléctricamente, como la fijación no selectiva de proteínas [16].

La agarosa está disponible como un polvo blanco que se disuelve en agua casi hirviendo y forma un gel cuando se enfría. La agarosa exhibe el fenómeno de la histéresis térmica en su transición de líquido a gel, al igual que el agar, es decir, se gelifica y se funde a diferentes temperaturas. Las temperaturas de gelificación y fusión varían según el tipo de agarosa. Las agarosas estándar derivadas de *Gelidium* tienen una temperatura de gelificación de 34–38°C y una temperatura de fusión de 90–95 °C, mientras que las derivadas de *Gracilaria*, debido a sus sustituyentes metoxi más altos, tiene una temperatura de gelificación de 40–52°C y una temperatura de fusión de 85–90°C [29].

La agarosa natural contiene grupos metilo sin carga y el grado de metilación es directamente proporcional a la temperatura de gelificación. Las temperaturas gelificación y de fusión pueden depender también de la concentración del gel, particularmente a una concentración de gel baja de menos del 1%. Por lo tanto, las temperaturas de gelificación y fusión se dan a una concentración de agarosa específica [29].

La Tabla 1, resume algunas características reportadas para agarosas comercializadas por la empresa estadounidense Sigma Aldrich, de las cuales existen alrededor de 23 productos disponibles a través del proveedor Merk, con un amplio rango de propiedades y valores [32].

Tabla 1: Características productos agarosa presentes en el catálogo de la empresa Sigma Aldrich [32] y un producto de Fermento Biotec, producido en Chile (\*)[33].

Propiedad	Productos comercializados				
	Agarosa baja EEO (A4679)	Agarosa baja T de gelificación (A0701)	Agarosa (A9414)	Agarosa especial alta EEO (A5304)	Agarosa * Lafken LM
Fuerza de gel (g/cm <sup>2</sup> ) [1%p/v]	≥ 1200	≥ 250	≥ 200	≥ 700	≤ 500 [1.5%]
T gelificación (°C) [1,5% p/v]	34 - 38	26 ± 2	26 - 30	36 ± 1,5	24 - 28
T fusión (°C) [1,5% p/v]	88 ± 2	65 ± 1	≤ 65	-	65,8
Sulfatos (%)	≤ 0,20	≤ 0,40	≤ 0,10	≤ 0,20	≤ 0,12
Usos	Electroforesis, inmunoelectroforesis	Electroforesis	Cultivo células mamíferas	Electroforesis, inmunoelectroforesis	Electroforesis

## 2.2.1. Métodos de extracción

Se han publicado numerosos estudios sobre la preparación de agarosa desde agar, basados en un principio básico de separación en función de las diferentes cargas iónicas de la agarosa y de la agarpectina [23].

Algunos procedimientos utilizaron sal de amonio cuaternario como reactivo para precipitar la agarpectina y dejar agarosa en la solución. Sin embargo, se reportó la dificultad de remover efectivamente el precipitado de la solución de agarosa, se descubrió que la adición de polisacáridos como la carragenina, cuyo contenido en sulfatos es mayor, formaba una floculación separable con la sal de amonio cuaternario. Luego se informó la adopción de alquilenglicol de bajo peso molecular para la purificación de la agarosa. Para mejorar esta metodología fue creada la metodología que utiliza polietilenglicol, el cual, precipita selectivamente las moléculas no cargadas. La cromatografía de intercambio iónico también se utiliza para separar agarosa de otros polisacáridos cargados [23].

Basándose en gran medida en estos métodos, han aparecido otras publicaciones y patentes que modifican o mantienen estos principios para los procesos de preparación de la agarosa. En ocasiones se han utilizado sucesivamente dos o incluso tres métodos de fraccionamiento en intentos de mejorar la calidad de la agarosa [16]. Para adaptarse a las modernas aplicaciones de la agarosa en bioquímica se ha requerido la introducción de modificaciones en la estructura química de esta molécula, mediante química orgánica sintética en muchos casos [23].

Los efluentes producidos durante la extracción de agarosa mediante métodos convencionales constituyen un problema de contaminación. Además, se necesitan reactivos químicos agresivos y los costes de extracción son elevados. Esto ha llevado a la necesidad de técnicas ecológicas, rentables y sostenibles para la extracción de agarosa, sin embargo, estas nuevas técnicas aún representan tecnologías poco accesibles comercial y económicamente [17].

Se han realizado varios métodos alternativos para extraer agarosa mediante extracción con disolventes modificados y el uso de biosolventes. Como ejemplo de la extracción con disolventes, está el uso de dimetilsulfóxido (DMSO) para la extracción de agarpectina y la preparación de agarosa de alta calidad, este método utiliza un tiempo de proceso más corto y es más eficiente comparado con los métodos convencionales [17].

Por otro lado, la extracción por líquidos iónicos es un ejemplo del uso de biosolventes, estos son compuestos formados únicamente por iones y se consideran un disolvente más ecológico, además, sus propiedades biodegradables y no tóxicas mejoran su funcionalidad como disolvente para el aislamiento de la agarosa. Pueden recuperarse y reutilizarse para lotes posteriores, siendo ventajoso para el proceso, ya que se consumen menos disolventes frescos y no se producen los problemas de eliminación de residuos tóxicos que se experimentan con los disolventes convencionales [17].

De las tecnologías probadas, la metodología que utiliza polietilenglicol resulta ser una opción de extracción prometedora por la disponibilidad de sus materiales y ausencia de disolventes tóxicos. A continuación, se detallarán las características de esta metodología, la que formó parte de una patente comercial de producción industrial de agarosa.

## 2.2.2. Precipitación con polietilenglicol

El polietilenglicol, conocido como PEG, es un polímero termoplástico obtenido mediante la polimerización del óxido de etileno, más específicamente es un poliéter lineal o ramificado con un grupo hidroxilo en cada extremo. El polietilenglicol tiene la ventaja de estar ampliamente disponible comercialmente y de que puede obtenerse en casi cualquier peso molecular deseado a un coste razonable. Los distintos tipos de PEG se diferencian según su peso molecular medio del cual toman el nombre. Este polímero es altamente soluble en agua, por lo que la mayoría de sus aplicaciones se dan en disoluciones acuosas, sin embargo, al aumentar el peso molecular disminuye tanto la solubilidad como la higroscopía. Este material es biodegradable, biocompatible y no tóxico, además, está reconocido por la FDA como GRAS (compuestos generalmente reconocidos como seguros) y ha sido aprobado para su consumo interno [34].

Las soluciones de PEG se están trabajando como medios de reacción ecológicos, sobre todo debido al gran interés actual por la química de separación ecológica. Lo más relevante en el uso de esta técnica es que el efecto del PEG es completamente reversible, por lo que puede eliminarse de las fracciones mediante extracción con un disolvente adecuado y puede ser recuperado de la disolución mediante extracción con disolvente o por destilación directa [18][34].

En las primeras aplicaciones de la metodología de precipitación de agarosa con polietilenglicol, se trataba la solución de agar con un líquido acuoso que contiene polietilenglicol disuelto con un peso molecular de al menos 300 g/mol, en concentraciones tales que hacen que la agarosa se vuelva insoluble en el líquido acuoso y separar la fracción insoluble resultante, donde la proporción de agaropectina disuelta el líquido acuoso es mayor que en la mezcla original [18].

En posteriores mejoramientos de la metodología, esta consistía en disolver al agar en un líquido acuoso, tras lo cual se añade polietilenglicol sólido en una cantidad adecuada para precipitar selectivamente la agarosa de dicha mezcla [27]. Este se debe llevar a una temperatura superior a la temperatura de gelificación de la solución coloidal e inferior a la temperatura a la que se produce una degradación sustancial de la agarosa dentro del periodo tiempo al que se somete a dicha temperatura. A temperaturas más bajas, la solución o dispersión puede empezar a gelificarse durante el proceso, lo que puede afectar negativamente el proceso [18].

En 1967, este procedimiento se patentó en estados unidos, e indican que preferentemente, el fraccionamiento se lleva a cabo a una temperatura superior a 60°C. Reportan que, a temperaturas más bajas, entre 50 y 60°C, la agaropectina tiende a precipitar en mayor medida, junto con la agarosa. A temperaturas inferiores como 40°C, las soluciones coloidales tienden a solidificarse. Destacaban que a temperaturas más altas mejora el poder fraccionador del PEG, por lo que, preferían llevar a cabo el tratamiento entre 70 y 100°C, más particularmente al menos entre 80°C y 90°C, teniendo muy buenos resultados. De hecho, la temperatura de precipitación inicial preferida es esencialmente a 90°C, temperatura a la que la precipitación es casi instantánea [18].

La agarosa es inestable a altas temperaturas, lo que influye en la elección del límite superior de temperatura. Por otra parte, la degradación a altas temperaturas también es función del tiempo y, por lo tanto, el proceso podría llevarse a cabo a altas temperaturas, incluso por encima el punto de

ebullición del agua si se lleva a cabo bajo presión, siempre que el tratamiento se realice tan rápidamente que la degradación sea insignificante. Tales temperaturas elevadas pueden elegirse si se desea, por ejemplo, por razones económicas, tratar soluciones coloidales de concentración tan elevada que serían demasiado viscosas para el tratamiento a temperaturas más bajas [18].

En aplicaciones de esta metodología se usaron temperaturas entre 50-60°C para precipitar agarosa desde agar comercial, con un rendimiento aproximado de 50% y obteniendo una agarosa con un porcentaje de sulfatos de 0.6% [27]. Más recientemente se utilizó la precipitación de agarosa con PEG en agar del alga *Ahnfeltia plicata*, donde se eligió 70°C como temperatura de elución, ya que se reporta que el uso de temperaturas más altas, entre 80°C y 100°C, provocaba la coprecipitación de agaropectina, mientras que temperaturas más bajas, entre 40°C y 60°C, provocaba la precipitación de agar, en este estudio se obtiene una agarosa con un contenido de sulfato de 0,28% [23].

Factores que afectan este proceso son la fuente de donde proviene el polietilenglicol, ya que puede diferir en propiedades relevantes para el proceso, también los diferentes tipos de agar o de diferentes fuentes pueden tener características muy variables, por lo que se recomienda realizar experimentos preliminares para determinar las condiciones óptimas en cada caso particular [18].

El PEG está disponible en diversos pesos moleculares, siendo los pesos moleculares medios comprendidos entre 1.500 y 10.000 g/mol los que resultan más adecuados para este proceso. Generalmente se impone un límite superior al peso molecular del polietilenglicol por el hecho de que, a la concentración y temperatura empleadas, la viscosidad de la solución resultante debe ser lo suficientemente baja como para que pueda separarse de ella un precipitado por centrifugación u otros medios. Al usar polietilenglicol de peso molecular 6000 g/mol, se observó consistentemente que en la mayoría de los casos este era adecuado para una precipitación virtualmente completa de agarosa, independientemente de la concentración de agar o agarosa en la solución tratada. Este es generalmente encontrado ventajoso por razones económicas para tratar soluciones coloidales acuosas de concentración alta. En general, la concentración debe ser tal que la solución coloidal siga fluyendo fácilmente, lo cual, como ya se ha mencionado, también depende de la temperatura [18].

Otro factor que afecta la precipitación de la agarosa es la concentración de polietilenglicol en la mezcla de reacción. Si se desea o es necesario, el fraccionamiento puede realizarse en varias etapas, por ejemplo, mediante un aumento escalonado de la concentración de polietilenglicol y la eliminación del material precipitado entre los sucesivos aumentos de concentración. El aumento gradual de la concentración de polietilenglicol da lugar a la precipitación de fracciones de resistencia de gel decreciente, por lo que el proceso puede ser controlado para obtener precipitados de fuerza de gel controlada, por ejemplo, en las concentraciones más bajas de PEG sólo se precipitará la agarosa de mayor peso molecular, la cual tiene generalmente la mayor fuerza de gel [18].

Cuando una etapa de precipitación produce un fraccionamiento incompleto, el fraccionamiento puede llevarse a cabo por etapas tanto en la precipitación como en la fase líquida residual. La precipitación fraccionada puede llevarse a cabo aumentando continuamente o por etapas la concentración de PEG en la mezcla de reacción. Por otra parte, cualquier precipitado formado puede volver a disolverse y precipitarse tantas veces como se desee o se requiera para su posterior fraccionamiento o purificación [18]



## 2.3. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica ampliamente utilizada en la industria y en entornos académicos para comprender la estructura molecular y la composición de muestras. La espectroscopia FTIR utiliza energía infrarroja para analizar una muestra. La luz infrarroja se absorbe a frecuencias específicas directamente relacionadas con las energías de enlace vibratorio interatómico de la molécula. El instrumento FTIR emite radiación infrarroja a través de una muestra en el rango de entre 10.000 y 100  $\text{cm}^{-1}$ . La muestra absorbe parte de esta radiación, mientras que otra parte la deja pasar. Las moléculas de la muestra convierten la radiación absorbida en energía rotacional y/o vibracional [35].

La señal resultante se presenta como un espectro de longitudes de onda, generalmente en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , que representa una huella molecular de la muestra. Cada molécula o estructura química produce una huella espectral única, lo que convierte al análisis FTIR en una herramienta valiosa para la identificación química [35]. La posición (frecuencia) e intensidad de cada banda de absorción en el espectro FTIR contribuyen a la identificación característica de la molécula. Los diversos enlaces en una molécula vibran con diferentes energías, lo que resulta en la absorción de longitudes de onda específicas de la radiación [36].

Esta técnica se utiliza ampliamente en la industria y en laboratorios académicos para comprender la estructura de moléculas individuales y/o la composición de mezclas moleculares, lo que facilita el análisis de muestras en diversas áreas, incluida la investigación de materiales, la farmacología y la biología molecular. Sin embargo, la interpretación de los datos espectrales FTIR es fundamental para comprender la composición y la estructura química de una muestra. Aunque esta técnica es poderosa y tiene numerosas aplicaciones, la interpretación no es sencilla debido a la complejidad del espectro generado. Las bandas absorbidas en el espectro son discretas y degenerativas, y su posición puede variar según diversos factores químicos y matriciales. Por lo tanto, la interpretación del espectro requiere experiencia y conocimiento en técnicas espectrográficas [37].

La interpretación se basa en tres aspectos principales: el número de onda, que refleja la posición de la absorbancia y depende de la energía necesaria para la absorción; la intensidad del pico de absorbancia, relacionada con el dipolo/fuerza de enlace presente en las moléculas; y la forma de la banda IR, que proporciona información sobre el tipo de enlaces presentes [37].

A pesar de ser principalmente una herramienta cualitativa, el análisis FTIR también puede emplearse cuantitativamente para cuantificar grupos funcionales específicos, siempre y cuando se comprenda la química subyacente y se disponga de materiales de referencia estándar. La intensidad de la absorbancia se correlaciona con la cantidad de funcionalidad presente en la muestra. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el FTIR es una técnica analítica "gruesa", lo que significa que puede proporcionar poca información sobre trazas o pequeñas concentraciones de material en una muestra [37].

### 2.3.1. Análisis de composición química

Los polisacáridos sulfatados son un grupo de polímeros diversos que incluyen a la carragenina, el fucoidán y algunos polisacáridos sintéticos sulfatados químicamente. Existen para estos, tres bandas de absorción características en  $1200-1270\text{ cm}^{-1}$ ,  $1010-1060\text{ cm}^{-1}$  y  $900-800\text{ cm}^{-1}$ , correspondientes al estiramiento simétrico y asimétrico del doble enlace S y O y estiramiento del enlace simple C-O-S, respectivamente, estas se pueden utilizar para confirmar la unión de grupos sulfonilo a polisacáridos [35][36].

Las bandas típicas del agar se sitúan, por lo general, en  $700-1400\text{ cm}^{-1}$ . La banda localizada a  $740\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la unión C-O-C. La banda a  $805\text{ cm}^{-1}$  se reconoce como grupos sulfato en C-2 de 3,6 anidro-L-galactosa. La banda a  $820\text{ cm}^{-1}$  indicaban la presencia de grupos sulfato en el C-6 de la D-galactosa. La banda en  $845-855\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a los grupos sulfato en C-4 de la D-galactosa. La banda localizada a  $886\text{ cm}^{-1}$  está ligada a la flexión C-H en C-1 del  $\beta$  galactopiranosil. La banda en  $930\text{ cm}^{-1}$  está asignada a la vibración C-O-C de la 3,6-anhidro-galactosa. La banda detectada a  $1033\text{ cm}^{-1}$  y la de  $1148\text{ cm}^{-1}$  suelen atribuirse a las vibraciones de estiramiento C-O y C-C del anillo de piranosa. Las bandas identificadas a  $1250\text{ cm}^{-1}$  y  $1370\text{ cm}^{-1}$  se asignan a la vibración de estiramiento de los grupos éster sulfato [21][36][38][39].

# Capítulo 3: Metodología

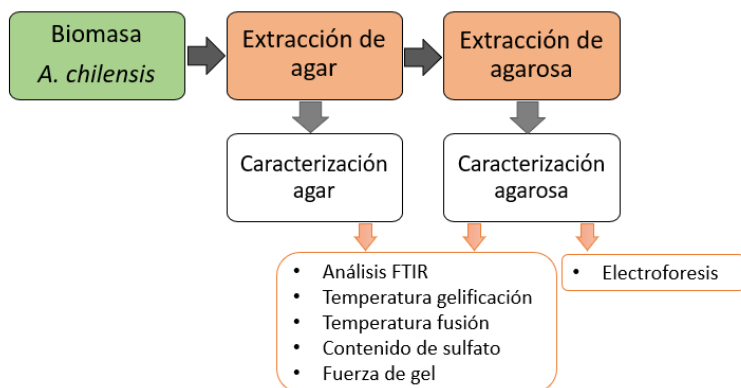


Figura 6: Esquema resumen de las metodologías experimentales.

[Elaboración propia]

En esta sección se presentan las metodologías experimentales utilizadas en el trabajo realizado, el cual se divide en 3 etapas principales, resumidas en la Figura 6. La primera corresponde a la extracción de agar desde la biomasa de *A. chilensis*, luego se realiza la extracción de agarosa desde el agar previamente extraído y finalmente se caracterizan los productos obtenidos. Cabe destacar que se utiliza la misma metodología para la caracterización de los agares y agarosas obtenidos, midiendo las mismas propiedades. Se adiciona a las agarosas, una prueba de electroforesis. Para cada etapa, se podrá encontrar una lista con los materiales y equipos utilizados, junto con el paso a paso de la metodología.

## 3.1. Extracción de Agar

En esta sección se describe la metodología seguida para la extracción de agar desde residuos algales *Agarophyton chilensis*. La Figura 7, muestra un diagrama de flujo del proceso. Los materiales y equipos utilizados se encuentran listados en el Anexo A.1.

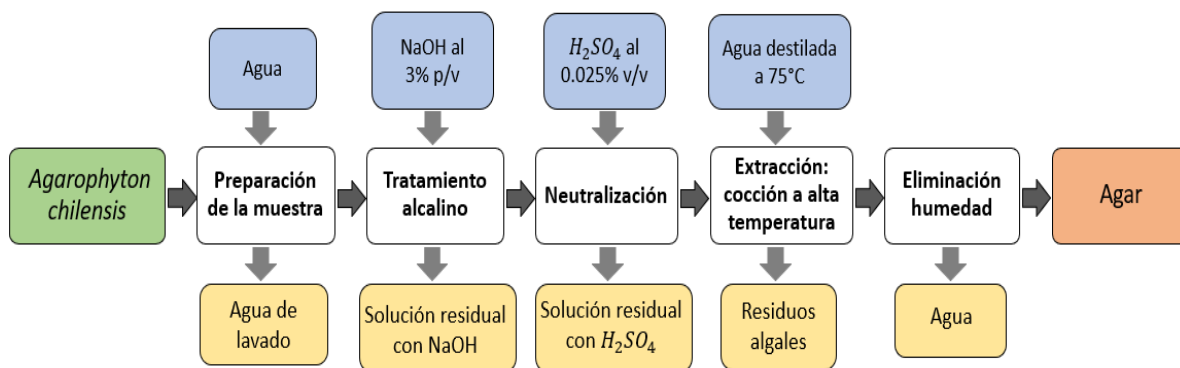


Figura 7: Diagrama de flujo proceso de extracción de agar desde biomasa de algas.

[Elaboración propia]

## **Preparación de la muestra**

1. Se lava el alga con agua corriente para quitar el exceso de arena y otros contaminantes y se pone a secar en la estufa a 60°C hasta peso constante, alrededor de 24 h.
2. El alga ya seca se homogeniza en una licuadora para obtener fragmentos de menor tamaño, que no sobrepasen los 2 cm. Se pesan 20 g del alga fragmentada en un vaso precipitado de 600 ml, que será la muestra por utilizar.
3. Se lava la muestra con 400 ml de agua destilada con agitación constante por 2 min, con el propósito de eliminar arena y restos de material marino que aun estén presentes.
4. Luego se filtra con dos capas de gasa, reteniendo el alga y eliminando el permeado alto en contaminantes. La muestra de alga húmeda se pone en un vaso precipitado limpio.

## **Tratamiento Alcalino**

5. Se inicia el pretratamiento alcalino agregando 400 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 3% p/v y mantener en suspensión durante 5 h a temperatura ambiente, con agitación constante.
6. Luego la solución alcalina se calienta a 85 °C por 1 hora a baño maría, con el propósito de eliminar el contenido de sulfatos presentes en el alga. Pasado este tiempo la solución caliente se filtra en dos capas de gasa para retener el material algal y eliminar la solución de hidróxido de sodio.
7. Las algas retenidas son enjuagadas con 600 ml de agua destilada para eliminar el exceso de hidróxido de sodio y se ponen en vaso precipitado limpio.

## **Neutralización**

8. Para neutralizar la muestra, se agregan 400 ml de una solución de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 0.025% v/v y se suspende a temperatura ambiente con agitación constante por 2 h.
9. Luego se filtra nuevamente con gasa y se conserva la masa de algas neutralizada.

## **Extracción: Cocción a alta temperatura**

10. Para comenzar la extracción de agar, poner dentro de un vaso precipitado de 400 ml la muestra de alga neutralizada y agregar agua destilada caliente a 75°C.
11. Luego, calentar la solución en un agitador magnético hasta una temperatura entre 85-90°C y se mantiene a esta temperatura con agitación constante durante 2 h.
12. Pasado este tiempo, filtrar la muestra caliente con gasa, ejerciendo presión para obtener todo el líquido. Se usa un pisa papas o una prensa de preferencia.
13. Se pone la solución de agar caliente en tubos Falcón de 50 ml y se centrifugan a 2000g por 3min. Esto para eliminar impurezas visibles en el agar.

## Eliminación humedad

14. Dejar enfriar la solución filtrada a temperatura ambiente hasta que tome consistencia de gel. Verter el gel en una bandeja de plástico y congelar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.
15. Descongelar la muestra a temperatura ambiente, una vez que ya no se vea hielo, botar el agua resultante, reteniendo el gel. También se puede presionar el gel, para sacarle el máximo de agua posible.
16. Romper el gel y secar en estufa a  $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante, durante 24 h aproximadamente.
17. Finalmente se enfría la muestra y se pesa el agar obtenido para el posterior cálculo del porcentaje de rendimiento de agar.

## 3.2. Extracción de Agarosa

En esta sección se describe la metodología seguida para extraer agarosa desde el agar obtenido anteriormente desde el alga. Este proceso, cuyo diagrama de flujo se muestra en la Figura 8, se llevará a cabo mediante una precipitación con PEG, probando 4 temperaturas diferentes. Los materiales y equipos utilizados se listan en el Anexo A.2

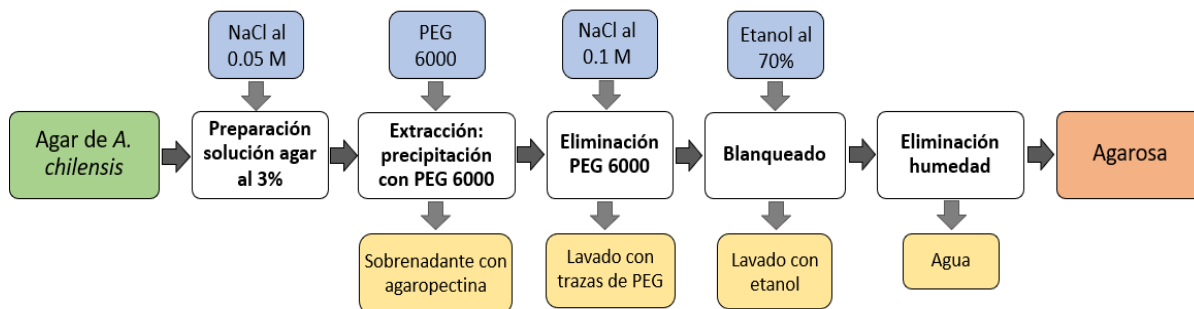


Figura 8: Diagrama de flujo proceso de extracción de agarosa mediante precipitación con PEG.

[Elaboración propia]

Tomando en cuenta las temperaturas evaluadas y utilizadas en las implementaciones de este mismo proceso que se reportaron en la sección 2.2.3, se establece un posible rango de temperatura de extracción, entre  $40^{\circ}\text{C}$  y  $90^{\circ}\text{C}$  [18][27]. Adicionalmente se considera que para el agar de *A. plicata* se reporta una temperatura de gelificación y fusión de  $33^{\circ}\text{C}$  y  $98^{\circ}\text{C}$  respectivamente y se extrajo la agarosa a  $70^{\circ}\text{C}$ , como temperatura óptima [23]. Mientras que para el agar de *A. chilensis* las temperaturas de gelificación y fusión son  $33.5^{\circ}\text{C}$  y  $87^{\circ}\text{C}$  aproximadamente [14]. Dado a la similitud observada, se plantea evaluar el proceso de extracción a  $50$ ,  $60$ ,  $70$  y  $80^{\circ}\text{C}$ .

## **Preparación solución agar**

1. Preparar una solución caliente de agar al 3% p/v. Para esto pesar 1.2 g de agar en un vaso precipitado de 100 ml y añadir 40 ml de solución de NaCl al 0.05 [M]. Calentar en un agitador magnético con agitación constante.

## **Extracción: Precipitación con PEG 6000**

2. Llevar la solución a la temperatura deseada de extracción (50-60-70-80°C) y añadir lentamente 12 gr de PEG 6000 sólido, esto se realiza durante 10 min con agitación constante, intentando mantener la temperatura estable.
3. Centrifugar la solución caliente 6300 g por 30 min y recuperar el floculante formado, desechando el sobrenadante. Esto se realiza separando la muestra en dos tubos Falcón de 50 ml.
4. Lavar dos veces el precipitado con una solución caliente de PEG 6000 al 25% en 0,1 M NaCl, añadiendo 30 ml de solución de PEG caliente a la temperatura usada para la precipitación y romper el pellet formado, luego centrifugar a 6300 g por 7 min y quedarse con el floculante formado.

## **Eliminación PEG 6000**

5. Lavar extensivamente el pellet con una solución de NaCl al 0.1 M, para extraer el PEG residual, para esto se añaden 30 ml de solución de cloruro de sodio en cada tubo y se rompe el pellet formado, y se centrifuga a 6300 g por 7 min. Esto se hará hasta que se compruebe que la solución de lavado no contiene trazas de PEG, entre 9 y 11 lavados.
6. Comprobación presencia de PEG: Después del lavado, poner 3 ml del sobrenadante en un tubo Falcón de 15 ml y añadir 150 µl de Lugol, agitar y observar el cambio de color en la solución.

La presencia de PEG forma una solución de café color oscuro al reaccionar con el Lugol, mientras que cuando ya no está presente se forma una solución de color amarillo. Se puede utilizar como blanco 3 ml de agua destilada con 150 µl de Lugol para tener una referencia del color al que se espera llegar.

## **Blanqueado**

7. Para blanquear la agarosa sin rastros de PEG, lavar nuevamente el pellet añadiendo 30 ml de etanol 70 % y rompiendo el pellet, para finalmente centrifugar a 8228 g por 8 min.

## **Eliminación humedad**

8. Pellet se extiende sobre bandejas de plástico y se seca en estufa a 40°C hasta peso constante. Se deja enfriar y se pesa la agarosa obtenida.

### 3.3. Caracterización productos

Las metodologías mostradas a continuación se realizaron de la misma forma para caracterizar los agares y agaros extraídas de *A. chilensis*. Los materiales y equipos utilizados para cada metodología se listan en el Anexo A.3.

#### 3.3.1. Medición contenido de sulfatos

Esta medición se realizó una vez en triplicado para los agares y agaros extraídas, mediante la medición de absorbancia con espectrofotómetro como se describe a continuación.

##### **Preparación reactivo de gelatina**

1. Añadir 75 mg de gelatina en polvo a 25 ml de agua ultrapura en un tubo Falcón. Incubar a 80°C por 10 min y luego homogenizar completamente en Vortex.
2. Añadir 250 mg de BaCl<sub>2</sub> y homogenizar completamente.

##### **Muestra hidrolizada**

3. Añadir 1 mg de polisacárido seco a un microtubo con 250 µl de HCl 0.5 M y agitar con Vortex por 60 s.
4. Incubar en un baño seco a 105°C durante 3 h. Luego dejar enfriar a temperatura ambiente.
5. Centrifugar la muestra a 13.400 g por 15 min a temperatura ambiente y transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo.

##### **Curva de calibración**

6. Preparar una solución patrón de sulfatos que contenga 10 mg/ml de ion sulfato, para esto, disolver una sal de sulfato como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en HCl 0.5 M.
7. Preparar soluciones estándar de sulfato con concentraciones entre 0.2 y 2 mg/ml diluyendo la solución patrón.

##### **Lectura absorbancia en microplaca**

8. Poner 140 µl de HCl 0.5 M en los pocillos de la microplaca que se necesiten medir.
9. Poner 20 µl de sobrenadante de cada muestra hidrolizada en la microplaca por triplicado.
10. Poner 20 µl de HCl 0.5 M como control negativo.
11. Poner 20 µl de las soluciones estándar de sulfato.

12. Mezclar el contenido con la función integrada en el lector, con el modo lineal por un minuto a 300 rpm y luego leer la absorbancia a 405 nm. Esta será la primera medición.
13. Añadir 40  $\mu$ l del reactivo de gelatina. En el lector, mezclar el contenido e incubar la microplaca por 20 min a temperatura ambiente.
14. Mezclar nuevamente y medir la absorbancia a 405 nm. Esta será la segunda medición.

### **Cálculo de sulfato**

15. Corregir los valores de absorbancia medidos restando los valores de la primera medición a la segunda.
16. Crear la curva de calibración graficando la absorbancia corregida de las soluciones estándar de sulfato en el eje y, versus su concentración conocida de sulfato en el eje x.
17. Usar la ecuación de regresión para estimar la concentración de sulfato en cada muestra y calcular el porcentaje correspondiente.

### **3.3.2. Análisis FTIR**

Para este estudio se enviaron las muestras de agar y agarosa al Laboratorio de Caracterización de Materiales, del Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales, de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, a cargo de la laboratorista Gloria Troncoso, quien las analizó mediante espectrometría FTIR ATR. Las muestras no necesitaban preparación previa, sin embargo, estas debían ser de al menos 1 mg y preferentemente en forma de película.

### **3.3.3. Temperatura de fusión**

Esta medición se realizó en dos ocasiones, en cada una de las cuales se usó un duplicado de cada muestra de gel de agar y agarosa.

#### **Preparación del gel**

1. Preparar un gel al 1.5% p/v, agregando agua destilada a la muestra seca (agar o agarosa) en un frasco con tapa. Disolver en autoclave por 30 min.
2. Poner 5 ml de gel en tubo de ensayo de vidrio, se deja gelificar y se mantiene a temperatura ambiente por al menos 20 h.

#### **Medición temperatura de fusión**

3. Se pone sobre el gel una bolita de vidrio de 3 mm pintada de negro. Se sumerge el tubo en un baño de agua a 95°C.



4. Observar el momento en que la bolita atraviesa el gel y cae al fondo del tubo, inmediatamente introducir un termómetro y registrar la temperatura de la solución. Esta será la temperatura de fusión.

### 3.3.4. Temperatura de gelificación

Esta medición se realizó en dos ocasiones, en cada una de las cuales se usó un duplicado de cada muestra de gel de agar y agarosa. Cabe destacar que este procedimiento se realizó posteriormente a la medición de la temperatura de fusión anteriormente descrita, aprovechando que la muestra se encontraba en solución.

#### **Medición de la temperatura**

1. Se sumerge el gel al 1.5% p/v en un baño de agua caliente y se espera que deje de ser gel.
2. Se sumerge el tubo en un agua fría con un termómetro dentro. Mientras la temperatura baja arrojar dentro del tubo pelotas de vidrio de 3 mm para observar si estas ingresan o no al interior de la muestra. Cuando estas ya no entran al gel y se corrobora que la muestra ya no fluye, registrar la temperatura como la temperatura de gelificación.

### 3.3.5. Propiedades reológicas

Adicionalmente a la medición de la temperatura de fusión y gelificación de las muestras de agarosa descritas anteriormente, se realizó un estudio de estas propiedades utilizando un Reómetro Híbrido Discovery HR-2, en el Laboratorio de Biomateriales e Ingredientes Funcionales (LIBIF), del Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos (DECYTAL), Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, a cargo del profesor Fernando Osorio.

Se realizó un barrido de temperatura a 1 ml de muestra de gel de agarosa al 1,5%, desde los 25°C hasta los 90°C, aumentando 2°C por minuto. Se utilizó una placa cónica de 60 mm y 1.008°, placa Peltier Acero – 108467.

Los resultados de estas mediciones no han sido analizados, debido a que se realizaron con posterioridad a la realización del trabajo experimental, estos se encuentran a disposición en el Anexo B para su posterior análisis.

### 3.3.6. Fuerza de gel

Esta medición se realiza en triplicado utilizando un Texturómetro Zwick Roell BDO-FBO, en el Laboratorio de Biomateriales e Ingredientes Funcionales (LIBIF), DECYTAL, Facultad Tecnológica, Universidad de Santiago de Chile, a cargo del profesor Fernando Osorio.

### **Preparación del gel**

1. Se prepara un gel al 1.5% p/v, disolviendo la muestra seca en agua destilada. Se prepara utilizando el autoclave por 30 min.
2. Se ponen aproximadamente entre 15-20 ml de gel en un tubo de plástico de 3,8 cm de diámetro y se mantiene a temperatura ambiente por 24 h.

### **Medición fuerza de gel**

3. Se monta la mesa de medición en el texturómetro y se inserta el embolo de medición, en este caso de geometría cilíndrica con un diámetro de 1,27 cm (0,5 pulgadas).
4. Se enciende el computador y el equipo, y se realizan los pasos necesarios para conectarlos y poder comenzar la mediciones, para esto se utiliza el programa “Test Xpert Machine”.
5. Posteriormente se deben seleccionar las especificaciones de operación, donde se establece la altura de inicio de la medición, que corresponde a la altura del gel, una velocidad de la prueba de 1 mm/s y una penetración en el gel de 5 mm.
6. Una vez configurada la medición, se posiciona el gel en el centro de la mesa de medición y se comienza con el ensayo, llevando el embolo a la altura del gel, presionando “LE” en el programa, luego se presiona “FORCE 0” para dejar en cero la fuerza aplicada y finalmente se presiona “START”. El equipo realiza la medición y se genera un gráfico de fuerza (N) versus la distancia de penetración (mm).
7. Una vez finalizada la medición, el equipo vuelve a la altura predeterminada y se deben guardar los archivos generados, que son un archivo Excel, con los datos medidos y un archivo Word, que contiene el gráfico generado y una tabla resumen de los resultados relevantes.

### **Cálculo fuerza de gel**

8. Posteriormente se toma el dato de fuerza máxima ( $F_{\max}$ ) que entrega el software, el cual también se puede identificar como el peak en el gráfico generado. Este se debe convertir de newton a gramos.
9. Luego el valor obtenido en gramos se divide en el área transversal del embolo utilizado. Obteniendo así la fuerza de gel en unidades de  $\text{g}/\text{cm}^2$ .

## **3.3.7. Idoneidad para electroforesis**

Para evaluar la capacidad de los geles de la agarosa extraída, se prepararon geles de electroforesis según lo descrito a continuación:

### **Preparación gel de electroforesis**

1. Prepara una solución de agarosa al 1% p/v con buffer TAE x1 y se le agrega tinción para ácidos nucleicos, GelRed®. Dejar enfriar un momento y vaciar la solución en el molde de gel de electroforesis. Dejar gelificar.

### **Corrida gel electroforesis**

2. Preparar la cámara de electroforesis llenándola con buffer TAE x1 y posicionando el gel en el centro, con los pocillos de carga hacia el lado donde se encuentra el polo positivo.
3. Cargar un pocillo con 2 µl de muestra, en este caso un leader de 1 kb. Cerrar la cámara.
4. Encender el voltímetro y dejar correr el gel con 70 V por 30 min.
5. Observar el gel en el generador de imágenes Gel Doc™ EZ Imager y guardar la imagen.

### **3.3.8. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para los datos recopilados de la caracterización de los polisacáridos extraídos, donde el factor evaluado para el agar fueron los diferentes lotes obtenidos, mientras que para la agarosa fue la temperatura de extracción utilizada. Este análisis fue realizado con la herramienta de análisis de datos del programa Excel y considero un intervalo de confianza de 0,05 para confirmar la existencia de diferencias significativas en los datos.

Posteriormente se utilizó el software GraphPad Prism 8 para realizar el mismo análisis estadístico. Par esto se proporcionaron los datos promedio, las desviaciones estándar correspondientes y el número de mediciones de cada propiedad medida y como se resultado se obtienen gráficos que explican visualmente las diferencias significativas entre los datos analizados.

# Capítulo 4: Resultados y Discusiones

A continuación, se presentan y discuten los resultados obtenidos de cada sección del trabajo experimental desarrollado. En el Anexo B, se puede encontrar una base de datos de los resultados, por si se requiere consultar alguno con mayor detalle.

## 4.1. Extracción de agar



Figura 9: Muestra de *G. chilensis* seca.

Para la realización de esta investigación se hicieron cuatro extracciones de agar desde *A. chilensis*, siguiendo la metodología descrita en la sección anterior. Estas se realizaron desde 20 g de alga seca (Figura 9) en triplicado, si bien no se registró el rendimiento de extracción de cada muestra, se estima que se encontró entre un 7% y 10%, ya que, en dos de las extracciones, se obtuvieron 4,3 g y 5,8 g de agar, desde los 60 g de alga que se usó en total.

Este rendimiento es menor al reportado para esta alga en estudios anteriores, de un 23% aproximadamente [14]. Esto se atribuye a las dificultades enfrentadas en la etapa de extracción, ya que, no se contaba con una prensa o instrumento adecuado para filtrar la solución caliente de agar desde la masa de algas, razón por la cual no se pudo recuperar en su totalidad. En una extracción previa se intentó obtener la mayor cantidad posible de solución, presionando fuertemente con la mano. Si bien se cumplió el objetivo buscado, se obtuvo un gel de agar con impurezas visibles, como se observa en la Figura 10.

Debido a esto y con información recopilada de procesos de extracción de agar, se decidió adicionar una etapa de purificación mediante centrifugación posterior al filtrado. Aunque esta contribuyó a la reducción del rendimiento obtenido, permitió obtener una solución de agar visiblemente libre de impurezas y un gel homogéneo, como el que se puede observar en la Figura 11.



Figura 11: Gel de agar con impurezas.



Figura 10: Gel de agar obtenido con la incorporación de la etapa de centrifugación.

En las extracciones previas de agar, se contaba con un equipo de liofilización para la etapa final de eliminación de la humedad, con el que se obtuvo un agar en forma de esponja (Figura 12), que luego se disolvía fácilmente al preparar una solución. Sin embargo, para las extracciones de los agares utilizados no se contaba con este equipo, por lo que se utilizó una estufa, donde se obtenía una lámina de agar (Figura 13), que se demoraba mucho más tiempo en disolverse, aun cuando se rompía en trozos más pequeños. Algunas referencias sugerían pulverizar estas láminas, sin embargo, no contábamos con un equipo que nos permitiera moler tanto la lámina, como para llegar a una consistencia de polvo.



Figura 13: Agar liofilizado.



Figura 12: Agar secado en estufa.

## 4.2. Extracción de agarosa

A continuación, se mostrarán y discutirán los resultados obtenidos de la extracción de agarosa a las cuatro temperaturas seleccionadas, de 50, 60, 70 y 80°C, basadas en resultados de estudios anteriores y en características del alga a utilizar. Cabe destacar que cada extracción de agarosa se realizó desde diferentes lotes de agar extraído de *G. chilensis*, por lo que algunos resultados se deben contrastar considerando las características del agar del cual proviene cada agarosa.

### Extracción de agarosa a 50°C

Esta extracción se realizó desde agar extraído el 14/12/23. La centrifugación en caliente realizada luego de la adición del PEG, entregó un pellet formado por 3 capas visibles, mostrado en la Figura 14. Como podemos observar, la capa 1, es de color café oscuro y se posa en el fondo del tubo, sobre esta se encuentra la capa 2, que es un pellet de color blanquecino y finalmente la capa 3 que corresponde a un gel semi transparente. Esto se menciona debido a que surgió la interrogante del contenido de cada una de estas fracciones del pellet, si bien se conservaron las 3, la parte gel fluía y parte de ella se perdía con el sobrenadante.

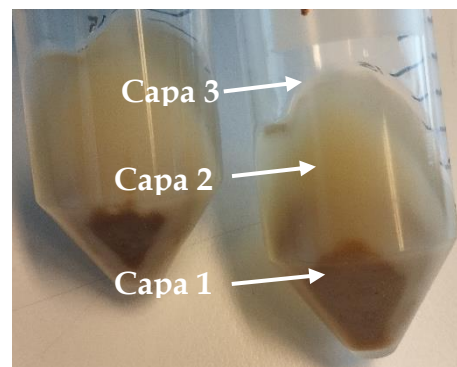


Figura 14: Pellet agarosa extraída a 50°C, con 3 capas visibles.

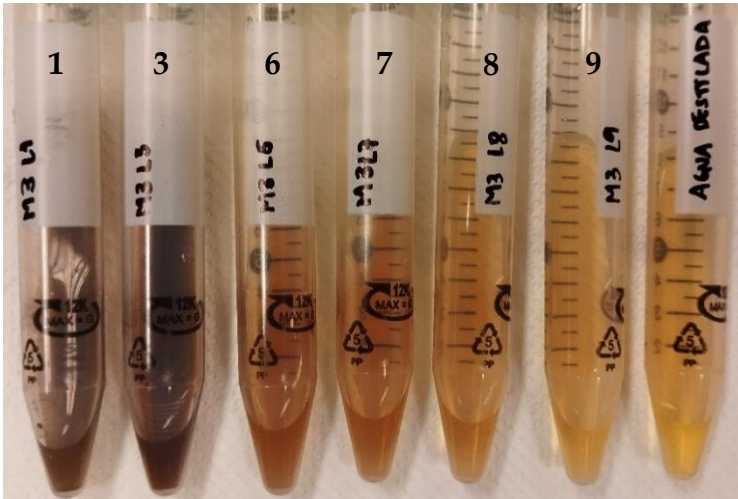


Figura 15: Prueba con Lugol para detectar trazas de PEG, realizada en el agua del lavado 1 hasta el lavado 9.

Para la eliminación de las trazas de PEG, fueron necesarios 9 lavados con la solución de 0,1 M NaCl. Este número fue determinado mediante la realización de una prueba con Lugol al sobrenadante de cada lavado, explicada en la sección Metodología. El Lugol reacciona con las trazas de PEG generando un color café oscuro, cuya intensidad va disminuyendo al disminuir el contenido de PEG, hasta quedar de un color amarillo. Para saber cuándo ya se había eliminado completamente, se buscaba conseguir el color generado en el agua destilada, cuando estos eran visiblemente iguales, ya no era necesario seguir con los lavados. En la Figura 15 se puede observar un ejemplo de los resultados de esta prueba, realizada al sobrenadante del lavado 1, 3, 6, 7, 8 y 9.

### **Extracción de agarosa a 60°C**

Esta extracción se realizó a partir de agar extraído el 08/12/2023. La centrifugación en caliente realizada luego de la adición del PEG, entregó un pellet formado por 2 capas visibles, mostrado en la Figura 16. Como podemos observar, una es de color café oscuro y se posa en el fondo del tubo de centrifuga y la otra una capa de gel blanquecino. En este proceso también fueron necesarios 9 lavados con la solución de 0,1 M NaCl, para la eliminación de las trazas de PEG.



Figura 16: Pellet agarosa extraída a 60°C.

### **Extracción de agarosa a 70°C**

Esta extracción se realizó desde agar extraído el 05/12/23. La centrifugación en caliente también entregó un pellet formado por 3 capas visibles, mostrado en la Figura 17, al igual que en la extracción a 50°C. En este proceso se realizaron 11 lavados con la solución de 0,1 M NaCl, para la eliminación de las trazas de PEG.

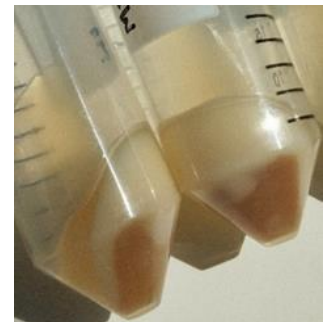


Figura 17: Pellet agarosa extraída a 70°C.

### **Extracción de agarosa a 80°C**

Esta extracción se realizó desde agar extraído el 18/12/23. La centrifugación en caliente entregó también un pellet formado por 3 capas visibles al igual que en la extracción a 50°C y 70°C. Fueron necesarios 11 lavados con la solución de 0,1 M NaCl, para la eliminación de las trazas de PEG.

## 4.2.1. Rendimiento extracción de agarosa

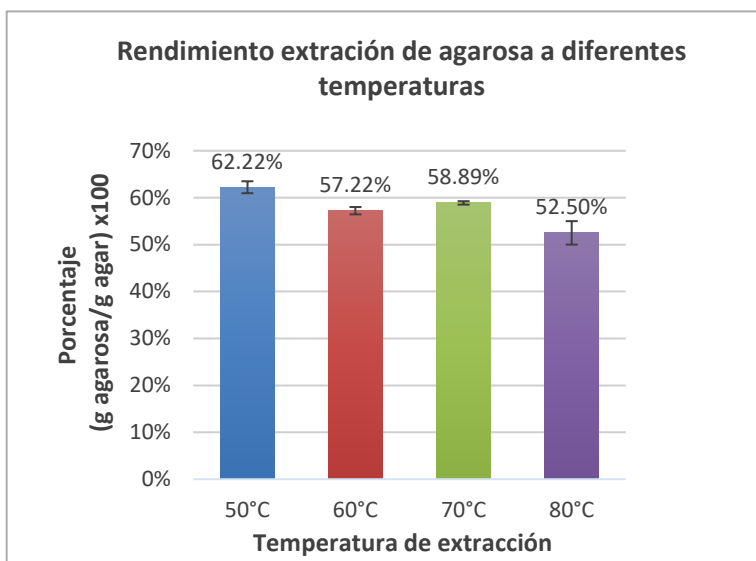


Figura 18: Gráfico rendimiento extracción de agarosa mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas. (n=3)

Se calculó el rendimiento del proceso considerando la masa seca de agar utilizada para cada extracción, que correspondía a 1,2 g, ejemplificado en el Anexo C. La extracción se realizó en triplicados, por lo que, los resultados mostrados en la Figura 18 representan el rendimiento promedio para cada temperatura, junto con las barras de error que muestran la desviación estándar. La Figura 19 muestra los resultados del análisis estadístico para estos resultados, y se puede observar que existen diferencias significativas entre la mayoría de los rendimientos obtenidos a las distintas temperaturas de extracción.

Analizando los resultados, podemos notar que la extracción con mayor rendimiento fue la realizada a 50°C, con un 62,22%, seguida por la de 70°C con un 58,89%, estos dos resultados no muestran diferencias significativas entre sí. Luego sigue la de 60°C, con 57,22%, la que tampoco muestra diferencias significativas con la de 70°C. Por otro lado, la de menor rendimiento fue a 80°C, con un 52,50%, que muestra diferencias significativas con las otras 3 temperaturas.

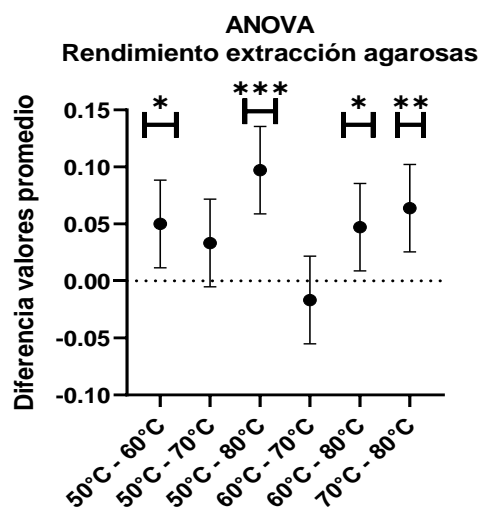


Figura 19: Resultados análisis estadístico para el rendimiento extracción de agarosas. Mayor número de \* representan una mayor diferencia significativa.

La misma metodología utilizada en este trabajo se usó para extraer agarosa desde el alga *Ahnfeltia plicata*, esta se llevó a cabo a 70°C y muestra un rendimiento de extracción aproximado de 56% [23]. Otros métodos que también utilizan precipitación con PEG, aunque mediante diferente metodología, reportan rendimientos entre 30 y 40% [18][27]. Otra fuente reporta un rendimiento de un 60-70% después de una primera precipitación, mientras que luego de 3 procesos se obtiene un rendimiento entre 30 y 45% [40].

Así los resultados obtenidos muestran concordancia con lo obtenido en *A. plicata*. También se puede considerar que el obtener mejores rendimientos que los reportados, se puede deber a un mayor contenido de agarosa en alga o también que el producto obtenido es de menor pureza.

## 4.3. Caracterización de polisacáridos

A continuación, se muestran los resultados de los diferentes análisis realizados a las agarosas obtenidas, junto con los agares de los cuales se extrajo cada una, para caracterizar los productos obtenidos y poder determinar la calidad de estos. También se muestran los resultados del agar comercial para cultivos bacteriológicos, “Difco™ Bacto Agar” (Becton Dickinson) y de la agarosa comercial para electroforesis de ácidos nucleicos, “SeaKem® LE Agarosa” (Lonza).

### 4.3.1. Apariencia

La Figura 20 muestra las agarosas extraídas luego de ser secadas en estufa y trituradas, en ellas se puede apreciar una leve diferencia de color. Las obtenidas a 50°C y 60°C muestran un color café oscuro, mientras que la obtenida a 70°C muestran un color dorado, finalmente la de 80°C presenta un color café más claro. Esta última presentaba además una textura diferente más cercana a un polvo, en cambio las otras 3, resultaban más parecidas a una película, lo que las hacía más difíciles de disolver. Es importante considerar que las agarosas comerciales son blancas en forma de polvo.

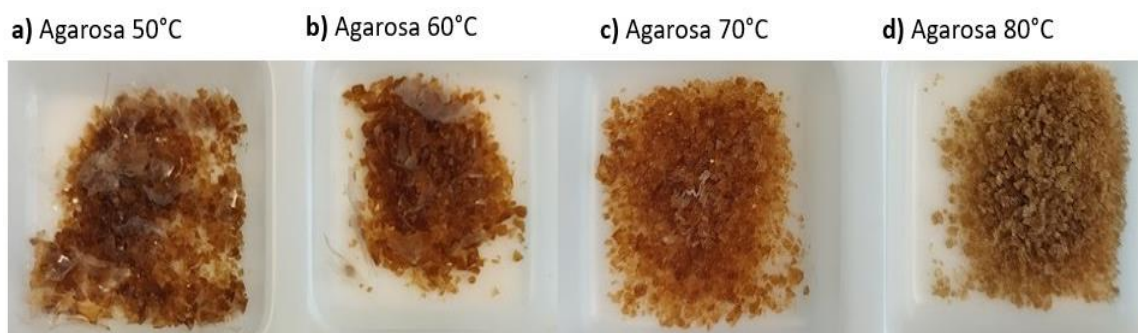


Figura 20: Agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas.

Cuando se prepararon geles de estas agarosas a una concentración de 1.5% p/v, también se pudo apreciar una diferencia en el color, el cual se va atenuando al aumentar la temperatura, lo cual se

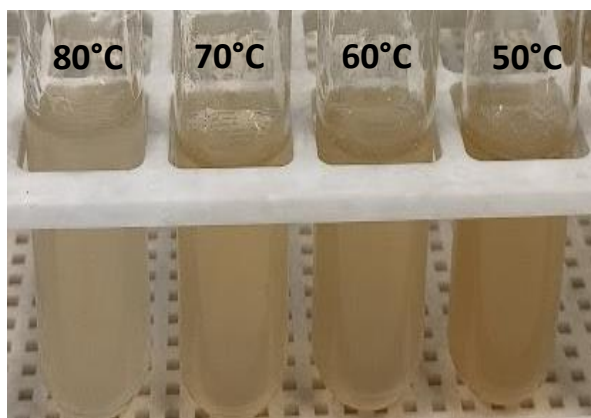


Figura 21: Geles de agarosa (1.5%) extraídas a diferentes temperaturas.

observa en la Figura 21, por lo que la temperatura de extracción puede tener efecto en esta característica. Sin embargo, hay que considerar el color del agar del cual fue extraída la agarosa. La Figura 22 muestra la comparación entre los geles de agarosa y el gel del agar correspondiente. Se puede observar que el agar más oscuro es el de la agarosa extraída a 80°C, la que resulta ser la más clara, por lo que ratifica la idea de que al aumentar la temperatura de extracción disminuyen los pigmentos presentes en la agarosa. También se puede apreciar la agarosa comercial es casi transparente, reflejando el color blanco del contenedor.



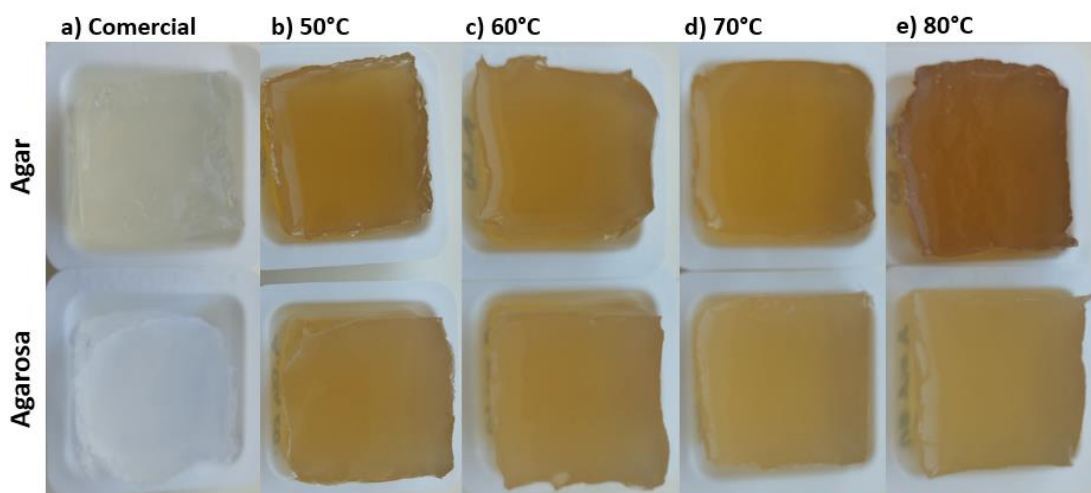


Figura 22: Geles de agar de *Agarophyton chilensis* y geles de agarosa extraídas a diferentes temperaturas por el método de precipitación con PEG (1,5% p/v).

### 4.3.1. Contenido de sulfato

A continuación, la Figura 23, muestra los resultados de la medición de sulfatos para las extracciones realizadas tanto de agar como de agarosa, expresados en porcentaje de sulfato, cuyo cálculo se ejemplifica en el Anexo D, donde también se encuentra la curva de calibración utilizada. La medición se realizó en triplicado, por lo que las barras representan el promedio obtenido y las barras de error muestran la desviación estándar. Por otro lado, la Figura 24 muestra los resultados del análisis estadístico para el contenido de sulfatos de los agares y agarosas.

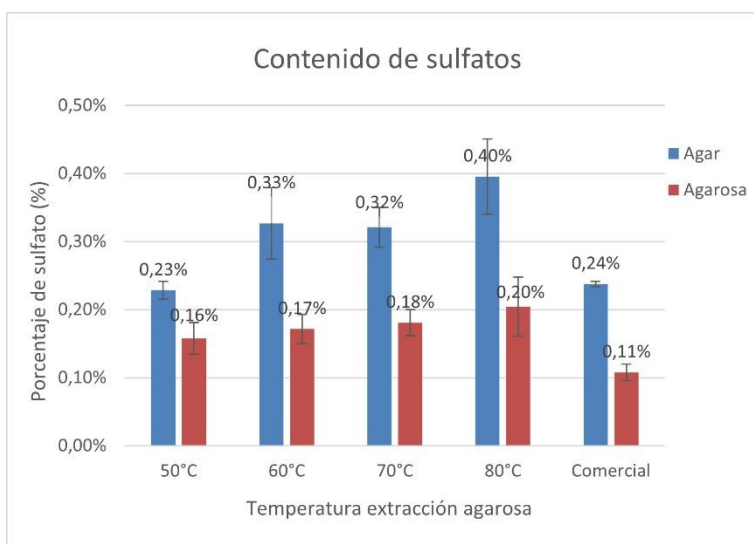


Figura 23: Gráfico contenido de sulfato agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas, con sus respectivos agares. (n=3)

Se puede observar que todas las agarosas presentan un porcentaje de sulfatos menor al agar del cual fueron extraídas, mostrando diferencias significativas en el análisis estadístico. Este comportamiento era el esperado, ya que, la metodología busca eliminar la fracción del agar que contiene los grupos sulfato. Esto también se ve reflejado en el comportamiento de los productos comerciales, que también tienen una diferencia significativa.

Podemos observar que los diferentes lotes de agar presentan diferencias en su contenido de sulfato, encontrándose entre un 0,23% del agar de la

extracción a 50°C y 0.40% del agar de la extracción a 80°C, los cuales muestran diferencias significativas (Figura 24.a), lo que ratifica que los resultados anteriores que nos mostraban que los agares tenían una composición diferente. El agar usado para la extracción a 80°C es el único que muestra diferencias significativas con el agar comercial, que tiene un contenido de sulfato de 0,24%, del cual no se reporta la especie de alga de la cual se extrae, lo que podría ser una variable que los haga diferir en esta propiedad. Sin embargo, en reportes anteriores de extracción de agar desde *A. chilensis*, se reportó un porcentaje de sulfatos de 1,6%, siendo un porcentaje mucho mayor al obtenido en esta experiencia, por lo que los agares obtenidos muestran tener un bajo contenido de sulfatos.

Al analizar el porcentaje de sulfato de las agarosas en la Figura 23, se puede apreciar que este porcentaje aumenta al aumentar la temperatura de extracción, sin embargo, el análisis estadístico no encuentra diferencias significativas (Figura 24.b). Esto sumado a la diferencia encontrada en los lotes de agar utilizado, no nos permite determinar una relación entre la temperatura de extracción y el contenido de sulfato de la agarosa obtenida. Sin embargo, podemos notar que a mayor temperatura disminuyó más el contenido de sulfato, pero no se puede atribuir solo a la temperatura, ya que quizá el hecho que el agar tenga un mayor contenido de sulfato permite que la extracción sea más eficiente.

Existen diferencias significativas con el contenido de sulfato de la agarosa comercial analizada para las agarosas extraídas a 70 y 80°C (Figura 24.b), sin embargo, todas las agarosas extraídas se encuentran dentro de los rangos reportados para algunos de los productos mostrados en la Tabla 1, con porcentajes de sulfato menores o iguales a 0,20% e incluso de 0,40%, por lo que la agarosa extraída desde *G. chilensis* tiene potencial para ser comercializada.

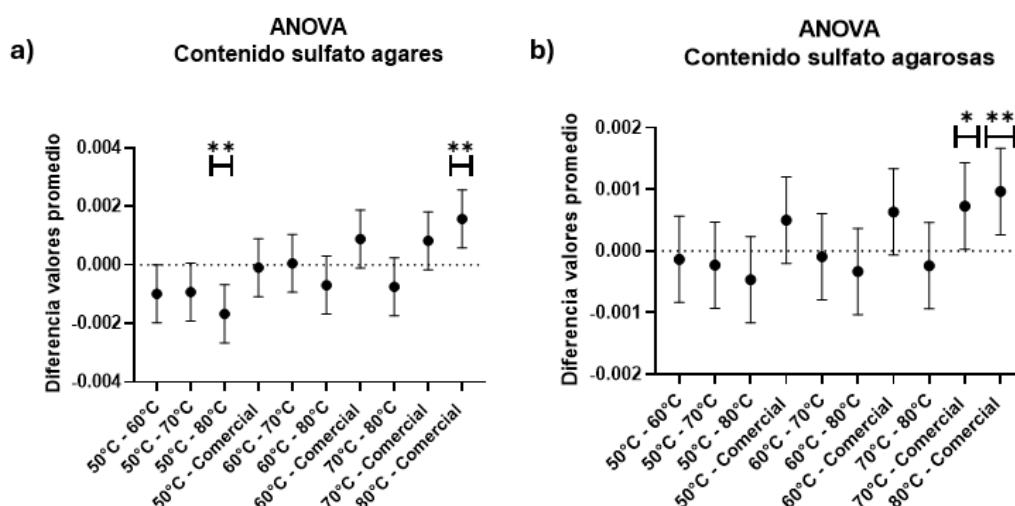


Figura 24: Resultados análisis estadístico ANOVA para el contenido de sulfatos de agares (a) y agarosas (b). Mayor número de \* representa una mayor diferencia significativa.

### 4.3.2. Espectrofotometría FTIR

A continuación, se muestran los resultados de los análisis mediante FTIR. Estos entregan un reporte que señala los porcentajes de similitud de las muestras analizadas con espectros almacenados en librerías, lo que permite identificar los compuestos presentes. La Figura 25, resume estos porcentajes respecto a los primeros 3 compuestos reportados para las cuatro agarosas extraídas y sus respectivos agares. Se incluyen agar y agarosa comercial. En el Anexo E.1 se puede encontrar el detalle de los porcentajes.

Para los agares, se muestran claras diferencias en el porcentaje de similitud con respecto al compuesto 343 de la librería, agar comercial con agua absorbida. El agar 80°C coincide un 55%, mientras el agar 60°C coincide un 95%. Los porcentajes respecto al compuesto agar polvo fino (1171) son más cercanos, estando en un rango entre 75% para el agar de 80°C y 87% para el agar de 60°C, mientras que el agar a 50 y 60°C son aproximadamente un 82%. El agar comercial analizado muestra resultados una similitud de 88% con el compuesto 343 y un 86% con el compuesto 1171. Esto nos muestra que los agares obtenidos varían mucho en su composición, a pesar de seguir la misma metodología de extracción, esto se puede deber al procesamiento previo de las algas, como el tamaño de triturado o hasta la utilización de partes diferentes del alga [16].

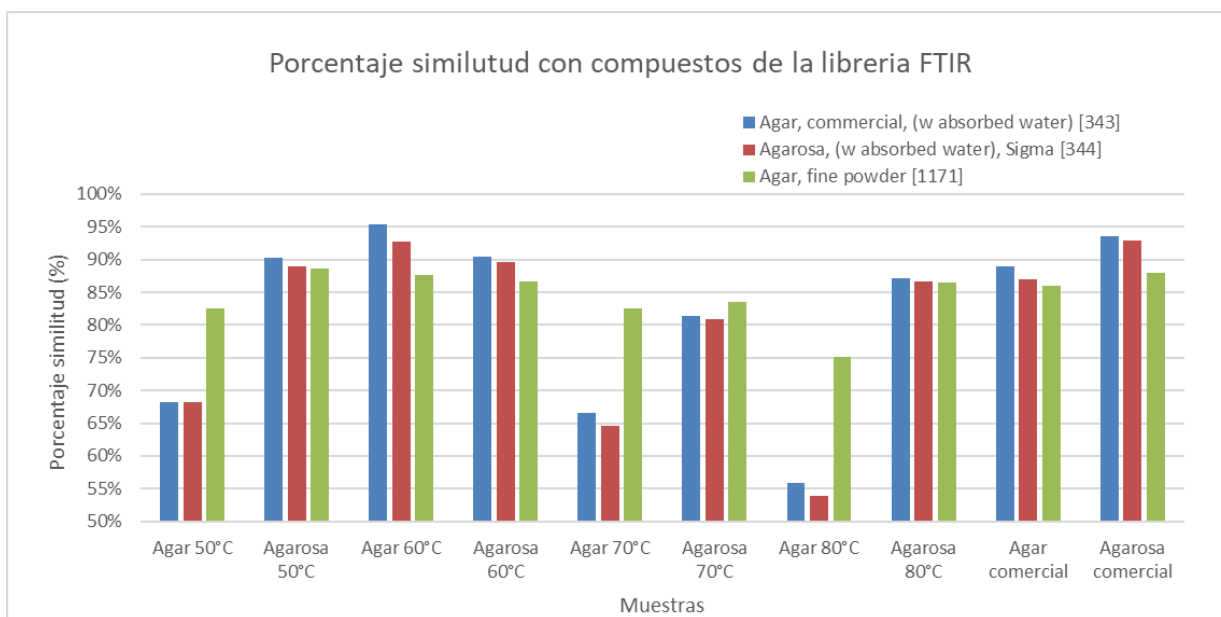


Figura 25: Gráfico de los porcentajes de similitud de los agares y agarosas extraídas con los compuestos disponibles en la librería FTIR.

Se observan cambios en los porcentajes de similitud las agarosas con respecto a los del agar de la cual se extrajeron, para las agarosas extraídas a 50, 70 y 80°C estos suben considerablemente, en cambio, la de 60°C muestra una disminución. Al concentrarnos en la comparación de las agarosas con el compuesto agarosa Sigma (344), la mayor similitud recae en la agarosa 60°C con 89,5%, disminuyendo 3% de similitud, sigue la agarosa de 50°C con 89% de similitud y un aumento de aproximadamente 21%, luego se encuentra la agarosa 80°C con una similitud de 86%, aumentando un 32%, finalmente la agarosa de 70°C concuerda en un 80% y aumentó 16%.

La agarosa comercial analizada tiene una similitud de 92%. Estos resultados nos muestran que la metodología de precipitación con PEG sirve para extraer agarosa desde diferentes agares y obtener agarosas con buena similitud a los productos comerciales registrados en las librerías, sobre todo con el comportamiento observado a 80°C. El comportamiento mostrado a 60°C no concuerda con lo observado a las demás temperaturas, por lo que se puede tratar de errores en el análisis de la muestra de su agar, ya que la medición con FTIR es muy sensible a la forma de la muestra y de medición [37].

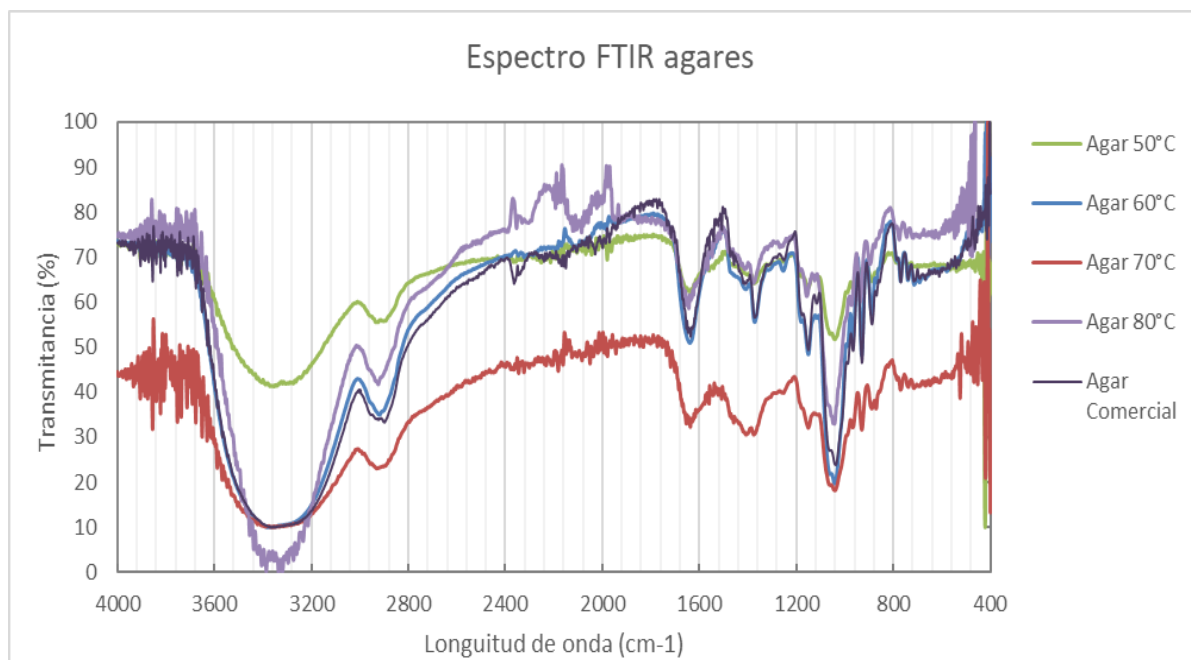


Figura 26: Espectros resultantes del análisis mediante FTIR para los agares extraídos de *G. chilensis*. Se incluye el espectro de agar comercial.

Por otro lado, el análisis mediante FTIR entrega el espectro de absorción de la frecuencia infrarroja de cada muestra, la cual es única para cada compuesto analizado según su composición química. Su análisis nos puede ayudar a entender cuáles son los compuestos presentes en la muestra y la causa de las diferencias en los porcentajes de similitud.

La Figura 26, muestra los espectros de los agares extraídos y del agar comercial, en la cual, podemos observar que en general todos los agares muestran espectros similares, con peaks ubicados en las mismas longitudes de onda. La Figura 27, muestra los espectros generados para las agarosas extraídas y la agarosa comercial. En estos espectros se observa que todas las agarosas extraídas tienen un espectro similar, marcando los mismos peaks característicos, pero de diferente intensidad.

Para poder apreciar la diferencia entre los espectros de agar y agarosa, la Figura 28 muestra un gráfico comparativo entre los espectros del agar y agarosa de la extracción a 50°C, los gráficos comparativos a las demás temperaturas de extracción se pueden encontrar en el Anexo E.2. Aquí se puede apreciar que ambos espectros siguen una forma similar marcando los mismos peaks, pero los de la agarosa presentan una mayor profundidad, es decir menor porcentaje de transmitancia, para todas las temperaturas.

Si bien teóricamente la transmitancia se relaciona inversamente con la absorbancia y por lo tanto con la concentración, en este caso no podemos usar estos espectros para comparar cuantitativamente los compuestos presentes, ya que la forma de la muestra influye en la cantidad de luz absorbida por la muestra, ya que no se ve un comportamiento igual en todas las comparaciones entre agar y agarosa. Por esto se van a destacar los peaks donde se pueden notar diferencias y a que compuestos se atribuyen.

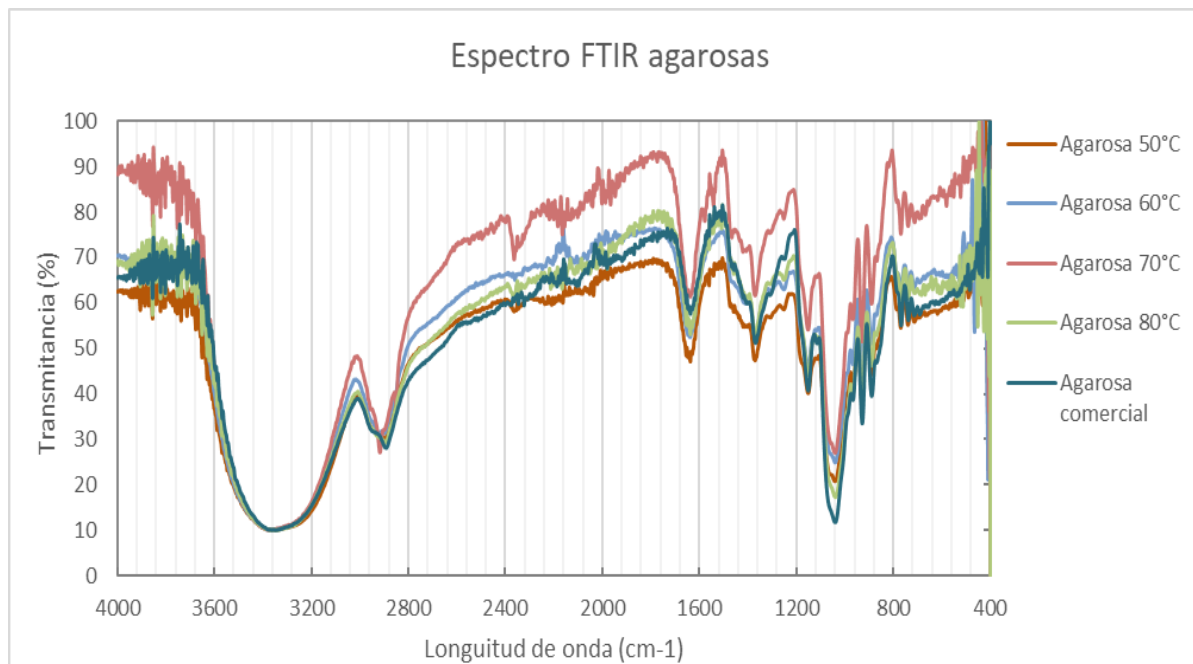


Figura 27: Espectros resultantes del análisis mediante FTIR para las agarosas extraídas mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas. Se incluye espectro de agarosa comercial.

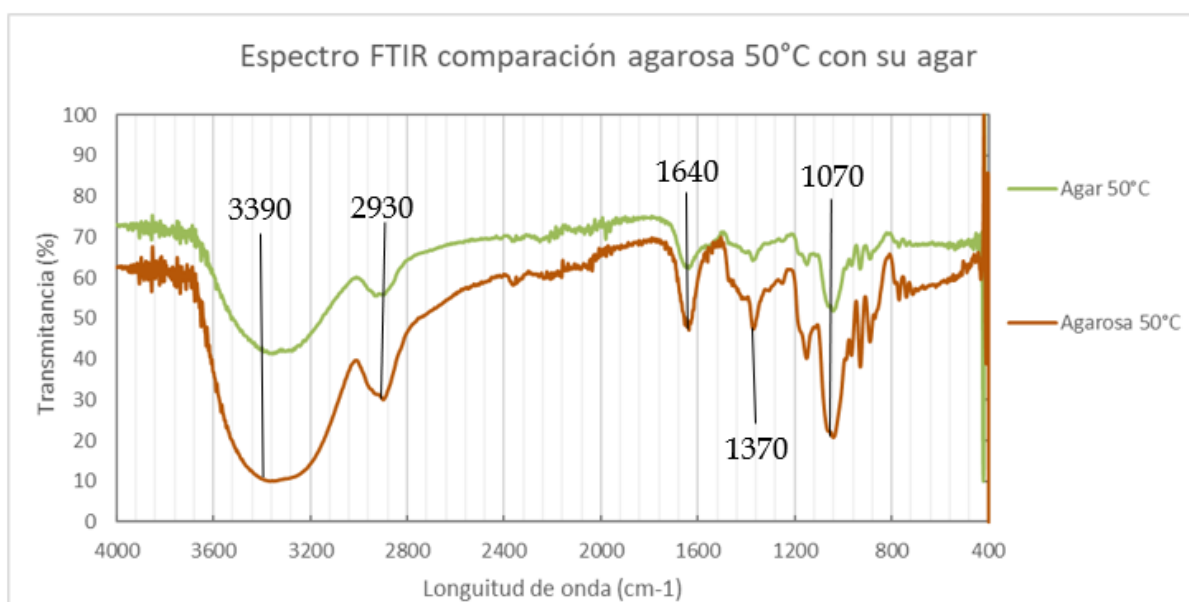


Figura 28: Espectros FTIR de la agarosa extraída a 50°C mediante precipitación con PEG y del agar del cual fue extraído.

Los peaks de absorción presentes a 3390, 2930, y 1640  $\text{cm}^{-1}$  que se ven más profundos para el espectro de agarosa se atribuyen a las vibraciones de estiramiento producidas por enlaces O-H, C-H, y C-O, respectivamente, mostrando así mayor presencia de puentes de hidrogeno y contenido total de azúcares, debido a la eliminación de grupos sulfatos y otros sustituyentes, lo que la aumenta la fuerza de la interacción entre las moléculas del esqueleto de la estructura.

La banda en 1370  $\text{cm}^{-1}$ , se asocia a la presencia de grupos sulfatos, si bien la agarosa tiene un contenido menor de sulfatos como se mostró en los resultados anteriores, este espectro muestra un porcentaje menor de transmitancia, lo cual se observa en todas las temperaturas de extracción. La región en 1070  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen al esqueleto de la estructura. Esto se puede deber a que la agarosa está más purificada por lo que su estructura presenta menos grupos sustituyentes y esto permite que los grupos aun presentes y las galactosas absorban más radiación.

### 4.3.1. Temperatura de gelificación

Los resultados de la medición de la temperatura de gelificación de los productos obtenidos en el trabajo experimental se muestran en la Figura 29, donde se puede encontrar la temperatura promedio medida junto con la desviación estándar correspondiente, representadas en las barras de error, esta figura se encuentra agrupada con la temperatura de extracción de las agarosas y el agar del cual se extrajo. En el Anexo F, se pueden encontrar los resultados más detalladamente. La Figura 30 muestra los resultados del análisis estadístico ANOVA.

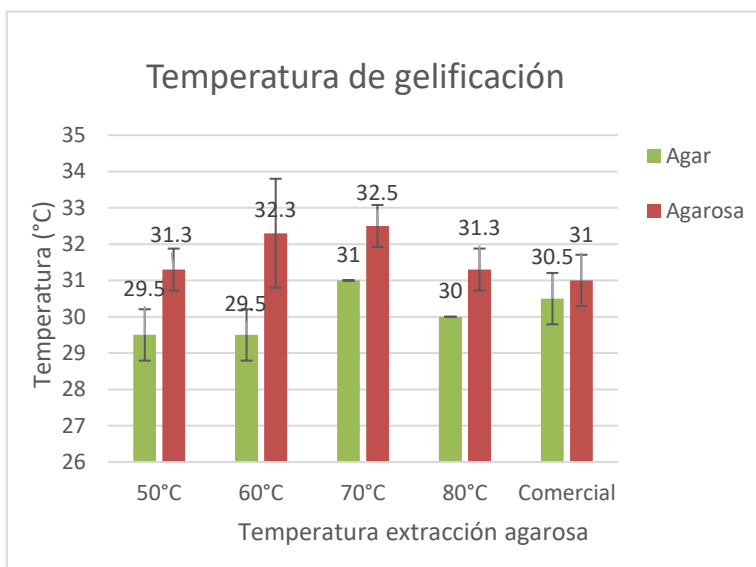


Figura 29: Gráfico temperatura de gelificación promedio de las agarosas extraídas mediante precipitación con PEG y sus respectivos agares. ( $n=4$  para agarosas) ( $n=2$  para agares)

29,5°C y 31°C (Figura 29). El análisis estadístico no muestra diferencias significativas (Figura 30.a), lo que muestra que esta propiedad se mantiene constante en los distintos lotes de extracción. La temperatura de gelificación del agar comercial fue de 30,5°C, se encuentra en el mismo rango

Podemos apreciar en la Figura 29 que las agarosas presentan una temperatura de gelificación levemente mayor que la del agar correspondiente, lo cual también ocurre para la agarosa y agar comercial, indicando que las agarosas obtenidas tienen un comportamiento similar a lo que se observa comercialmente. Sin embargo, solo las temperaturas de gelificación de las agarosas extraídas a 50°C y 70°C presentan diferencias significativas con la temperatura del agar del cual se extrajo.

Vemos que la temperatura de gelificación para todos los agares es muy similar, estando en el rango entre

de temperaturas y con la cual tampoco existen diferencias significativas, por lo que los agares extraídos son comparables con el agar comercial.

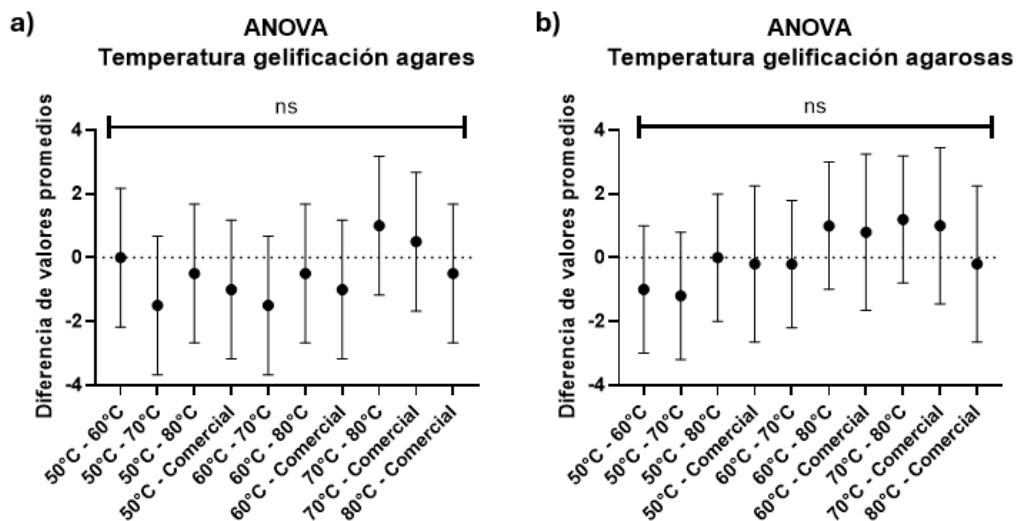


Figura 30: Resultados análisis estadístico ANOVA para la temperatura de gelificación de agares (a) y agarosas (b). El rótulo ns significa que no existen diferencias significativas.

Para las agarosas extraídas vemos temperaturas de gelificación muy cercanas, encontrándose en el rango entre 31,3°C y 32,5°C, y estas no muestran diferencias significativas (Figura 30.b). Vemos que la temperatura de gelificación de la agarosa comercial, de 31,5°C, se encuentra en el mismo rango de temperatura y no hay diferencias significativas, por lo que este análisis estadístico muestra que la temperatura de gelificación de las agarosas extraídas es comparable con la de la agarosa comercial, y que la temperatura de extracción no tiene un efecto claro en la temperatura de gelificación.

### 4.3.2. Temperatura de fusión

Los resultados de la medición de la temperatura de fusión de los productos obtenidos en el trabajo experimental se muestran en la Figura 31, que reporta la temperatura promedio medida junto con la desviación estándar correspondiente. La figura se encuentra agrupada con la agarosa extraída a cada temperatura y antes el agar del cual se extrajo. En el Anexo F, se pueden encontrar los resultados más detalladamente. Por su parte, la Figura 32 muestra los resultados del análisis estadístico ANOVA, realizado a los datos obtenidos para los agares y agarosas.

De la Figura 31, podemos observar que todos los agares extraídos muestran una temperatura de fusión similar, estando en un rango entre 72,5°C y 75°C, sin diferencias significativas (Figura 32.a). En este parámetro el agar comercial muestra una temperatura de 81,5°C, con la cual todos los agares extraídos muestran diferencias significativas.

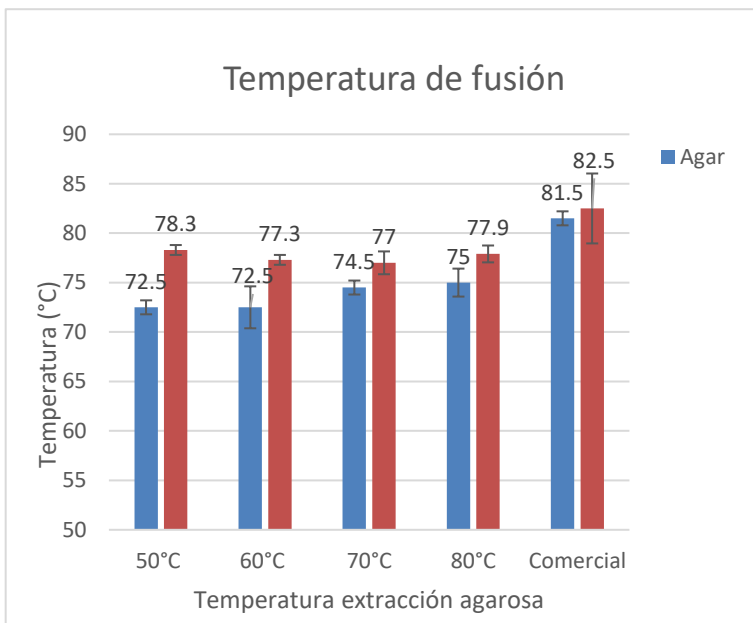


Figura 31: Gráfico temperaturas de fusión promedio para las agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas y sus respectivos agares. (n=4 para agarosas) (n=2 para agares)

Para la temperatura de fusión podemos ver que las agarosas de todas las temperaturas tienen una temperatura mayor a la temperatura de fusión de sus agares correspondientes (Figura 31), siendo la mayor diferencia la de la agarosa de 50°C, que supera por 5,8°C a la temperatura del agar del cual fue extraído y la menor diferencia se observa en la agarosa de 70°C, que la supera por 2,5°C. Esta diferencia también se observa en la agarosa y agar comercial, pero mostrando una menor diferencia.

El aumento de la temperatura de fusión podría atribuirse a la disminución significativa del contenido de sulfato entre agar y agarosa, lo que potencia la interacción de los enlaces

de hidrógeno y las moléculas de agarosa, requiriéndose más energía para fundir el gel.

Para las agarosas extraídas podemos ver en la Figura 31 que las temperaturas de fusión son cercanas entre sí, encontrándose en el rango entre 77°C y 78,3°C, sin diferencias significativas (Figura 32.b). La temperatura de fusión de la agarosa extraída a 50°C es la mayor reportada, de 78,3°C, esto coincide con el hecho de que la agarosa de 50°C tiene el menor contenido de sulfatos.

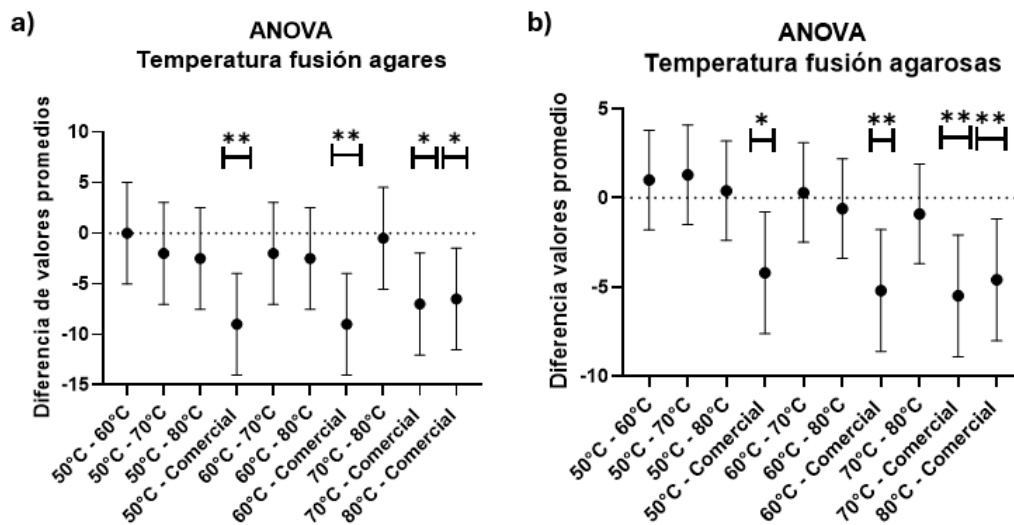


Figura 32: Resultados análisis estadístico ANOVA para la temperatura de fusión de sulfatos de agares (a) y agarosas (b). Mayor número de \* representan una mayor diferencia significativa.



Vemos que la temperatura de fusión de la agarosa comercial es mayor a las de las agarosas obtenidas, siendo de 82,5°C (Figura 31), mostrando diferencias significativas con las temperaturas de fusión de las todas las agarosas extraídas (Figura 32.b), sin embargo, la agarosa extraída a 50°C es la que presenta una menor diferencia, mostrando que esta temperatura de extracción nos entrega un producto que se acerca más a las características comerciales.

### 4.3.3. Fuerza de gel

Los resultados de las mediciones de fuerza de gel para las agarosas obtenidas mediante extracción con PEG a diferentes temperaturas, junto con los de agar y agarosa comercial se pueden observar en la Figura 33, esta muestra la fuerza de gel promedio obtenida de las tres mediciones y las barras de error representan la desviación estándar. Por otro lado, la Figura 34, muestra los resultados del análisis estadístico. El Anexo G contiene un ejemplo de cálculo.

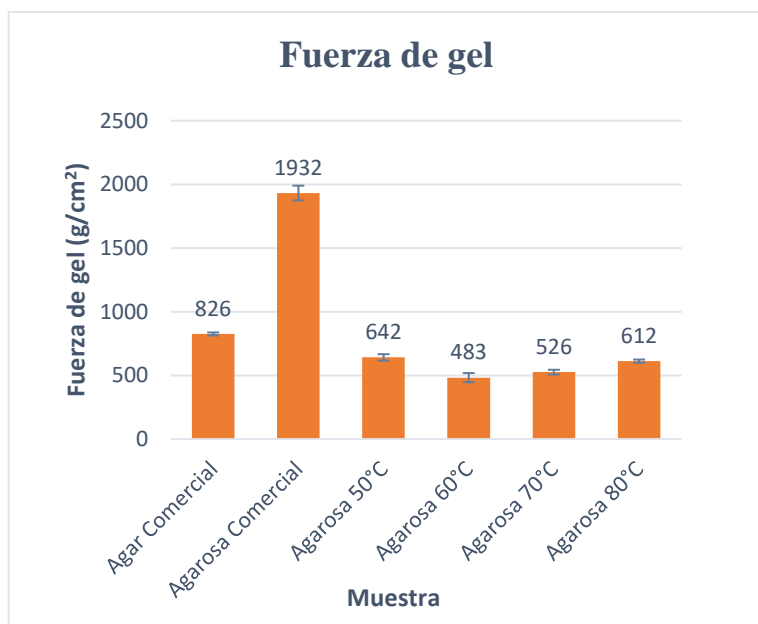


Figura 33: Gráfico resultados fuerza de gel para agarosas extraídas mediante precipitación con PEG, a diferentes temperaturas.

Se incluyen mediciones de agar y agarosa comercial. (n=3)

Analizando los resultados podemos observar de la Figura 33 que la agarosa extraída a 50°C fue la que mostró una mayor fuerza de gel con un promedio de 642 g/cm<sup>2</sup>, seguida por la agarosa obtenida a 80°C con 612 g/cm<sup>2</sup>, de la Figura 34, vemos que estas dos no presentan diferencias significativas entre sí, mientras la mayor si muestras diferencias significativas con las dos restantes que mostraron valores de fuerza de gel de 526 y 483 g/cm<sup>2</sup>, correspondientes a las agarosas extraídas a 70°C y 60°C respectivamente. Estas dos últimas tampoco muestran diferencias significativas entre sí, al igual que la de 80 y 70°C. Finalmente la de 60°C si presenta diferencias significativas con la agarosa a 80°C.

Como podemos observar la agarosa comercial medida muestra una fuerza de gel mucho mayor a la reportada para las agarosas extraídas (Figura 33), de 1932 g/cm<sup>2</sup>, mostrando una gran diferencia significativa con todas las temperaturas (Figura 34), lo que nos muestra que en esta propiedad las agarosas obtenidas no lograron acercarse al comportamiento de este producto comercial. Sin embargo, como se puede ver en la Tabla 1, están por sobre la fuerza de gel reportada para algunos productos comerciales aptos electroforesis, menores a 500 g/cm<sup>2</sup> y su fuerza de gel permite un fácil manejo, por lo que podrían ser un producto comercialmente viable.

Se esperaba que esta propiedad tuviera relación con el contenido de sulfatos de las muestras, y si bien, coincide que la agarosa a 50°C es la con menor contenido de sulfatos y con mayor fuerza de

gel, las demás muestras no siguen el orden de contenido de sulfato, sin embargo, hay que considerar que no se observaron diferencias significativas en esa propiedad.

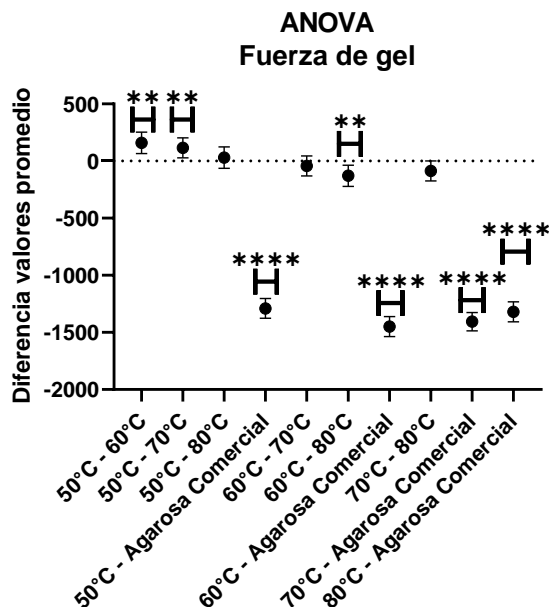


Figura 34: Resultados análisis estadístico ANOVA para agarosas extraídas a diferentes temperaturas y agarosa comercial. Mayor número de \* representan una mayor diferencia significativa.

#### 4.3.4. Idoneidad para electroforesis

La Figura 35 muestra los resultados de la prueba de electroforesis que se realizó para las agarosas extraídas y la comparación con la agarosa comercial. Estas son imágenes de los gels de agarosa luego de realizar una electroforesis a un marcador de peso molecular de 1 kb por 30 min a 70 V.

La primera diferencia que podemos observar es la coloración que muestra el gel en el generador de imagen, vemos que la agarosa comercial no se ve en la imagen, mostrando un color negro, mientras las agarosas extraídas se muestran de color plomo, por lo que puede indicar que tienen algún compuesto que la agarosa comercial no tiene. También observamos algunas impurezas en los gels de las agarosas de 70 y 80°C, mientras que el gel se 50°C se ve bastante liso.

También se puede observar que el gel de agarosa comercial muestra 7 bandas, donde las 3 superiores están difusas, mientras en el gel de agarosa extraída a 50°C, se pueden visualizar claramente 6 bandas, donde los dos superiores se encuentran difusas similar a lo que muestra el gel comercial, además, las bandas no avanzaron a misma distancia. Para el gel de agarosa 60°C, se aprecia que las moléculas más pequeñas de la muestra avanzan la misma distancia que para el gel de 50°C, sin embargo, las demás bandas se encuentran más cercanas unas de otras y se puede observar 4 bandas marcadas y dos que están difusas.

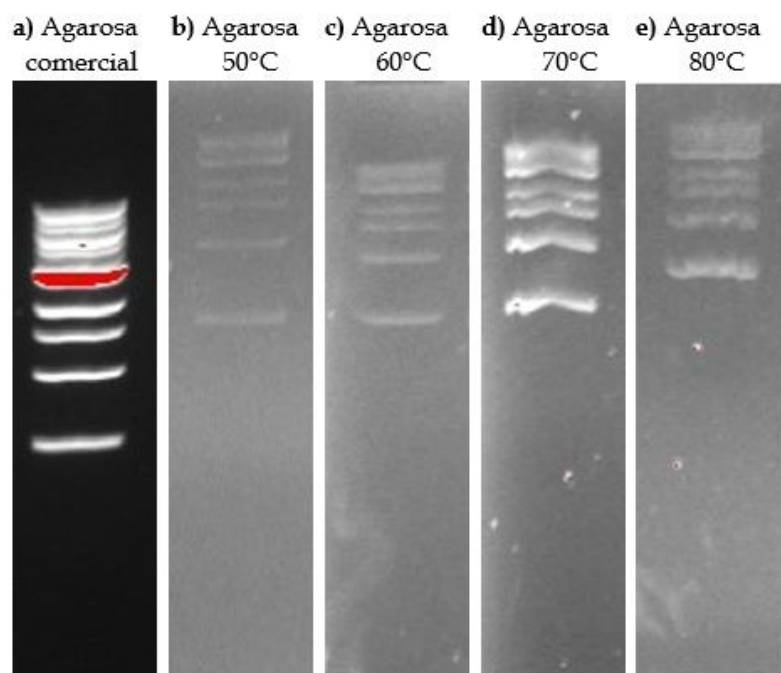


Figura 35: Resultados electroforesis en geles de agarosa extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas, desde agar de *G. chilensis*.

El gel de agarosa 70°C, presenta un comportamiento similar al anterior, con la distancia avanzada y sus bandas, sin embargo, este gel muestra bandas de forma irregular, lo que se puede deber a impurezas en el gel o que el gel no quedó homogéneo. Finalmente, el gel de agarosa 80°C, fue el que tuvo menor desplazamiento de la muestra y todas sus bandas son difusas, lo cual no pasa en los otros geles.

Estos resultados coinciden con la reducción del contenido de sulfato entre agarosas, donde la de menor contenido fue la agarosa extraída a 50°C, por lo que la reducción del contenido de sulfato disminuye la electroendosmosis y las bandas de electroforesis son más claras. A pesar de que en apariencia los geles de las agarosas extraídas a mayor temperatura presentaban una menor coloración, siendo más similares a la agarosa comercial, vemos que esta variable o afecta en el rendimiento del gel para electroforesis.

#### 4.3.5. Resumen de la caracterización de agarosas extraídas a diferentes temperaturas

Finalmente, para poder apreciar de forma más clara todos los resultados obtenidos para las agarosas se presenta la Tabla 2, donde se resumen las características de las agarosas extraídas a diferentes temperaturas, también se incluyen las características medidas de la agarosa comercial y un producto comercializado producido en Chile, para tener una referencia de las características de productos presentes en el mercado. Debido a la diferencia de los agares de los cuales se obtuvo cada agarosa, no se pueden relacionar las características obtenidas con la temperatura de extracción.

Es importante mencionar que las agarosas obtenidas presentaron diferencias significativas entre ellas solo en el rendimiento del proceso de extracción y en su fuerza gel. Para para la temperatura de gelificación no se observó ninguna diferencia significativa, mientras que en el contenido de sulfatos y la temperatura de fusión mostraron diferencias significativas solo con la agarosa comercial, siendo la agarosa con características más cercana a esta última, la extraída a 50°C.

Así, se determina que la agarosa extraída a 50°C es la de mayor calidad, debido a que presenta mayor similitud con la agarosa comercial analizada, incluyendo su sobresaliente performance en la electroforesis. Esto coincide con que fue el proceso que mostró un mejor rendimiento y el producto obtenido con una mayor fuerza de gel.

*Tabla 2: Resumen resultados caracterización agarosas extraídas mediante precipitación con PEG desde agar de G. chilensis. Se incluyen datos medidos para agarosa comercial SeaKem® LE Agarosa de Lonza y datos de catálogo para la Agarosa Lafken LM, de Fermento Biotec [33].*

<b>Muestra / Característica</b>	<b>Agarosa 50°C</b>	<b>Agarosa 60°C</b>	<b>Agarosa 70°C</b>	<b>Agarosa 80°C</b>	<b>Agarosa comercial</b>	<b>Agarosa Lafken LM</b>
Rendimiento (%)	62,22 ± 1,27	57,22 ± 0,79	58,89 ± 0,36	52,50 ± 2,50	-	-
Sulfatos (%)	0,16 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,11 ± 0,01	≤ 0,12
Fuerza de gel (g/cm <sup>2</sup> ) [1,5% p/v]	642 ± 25	483 ± 36	526 ± 19	612 ± 13	1932 ± 58	≤ 500
T. Gelificación (°C) [1,5% p/v]	31,3 ± 0,6	32,3 ± 1,5	32,5 ± 0,6	31,3 ± 0,6	31,0 ± 1,4	24-28°C
T. Fusión (°C) [1,5% p/v]	78,3 ± 0,5	77,3 ± 0,5	77,0 ± 1,2	77,9 ± 0,9	82,5 ± 3,5	65,8°C

# Capítulo 5: Conclusiones

A lo largo de este trabajo se logró implementar los procesos de extracción de agar desde biomasa de algas de *G. chilensis* y la posterior extracción de agarosa mediante precipitación con polietilenglicol. Se caracterizaron los productos obtenidos, mediante diferentes metodologías, logrando conocer propiedades físicas y químicas relevantes para sus aplicaciones comerciales. Esto permitió comparar la calidad del agar y agarosas extraídos con productos comerciales disponibles para uso en el laboratorio, los que también fueron caracterizados.

Si bien se buscó evaluar el efecto de la temperatura en el proceso de extracción de agarosa, realizando la metodología a cuatro temperaturas diferentes, no se logró cumplir este objetivo, debido a que cada extracción de agarosa se realizó de un lote diferente de agar, los cuales mostraron diferencias en su composición y su calidad, lo que puede afectar la calidad de la agarosa obtenida.

En los resultados para los lotes de agar, los análisis con FTIR mostraron espectros similares y con la presencia de peaks característicos para el agar, sin embargo, los porcentajes de similitud reportados estuvieron en un rango entre 75 y 87%. El agar comercial analizado mostró una similitud de 86% respecto a la librería del FTIR, pudiéndose igualar solo al agar utilizado para la extracción de agarosa a 60°C (agar 60°C), que obtuvo 87% de similitud. En el contenido de sulfato, solo uno de los lotes logró ser comparable con el agar comercial, el agar 50°C. Por otro lado, la temperatura de gelificación no mostró diferencias significativas entre los agares y el agar comercial. La temperatura de fusión fue menor a la obtenida para el agar comercial y no hubo diferencias significativas entre los lotes de agar.

Los resultados revelaron diferencias significativas al comparar las propiedades las agarosas con las del agar del cual se extrajo cada una. Tal como se esperaba, se disminuyó el contenido de sulfato, y aumentó el porcentaje de similitud con la Agarosa Sigma de la librería FTIR. Por lo que se puede concluir que se realizó una extracción de agarosa exitosa mediante precipitación con PEG, logrando eliminar las fracciones cargadas del agar.

El rendimiento en la extracción de agarosa mostró una relación inversa con el contenido de sulfato del agar, ya que, la extracción con mayor rendimiento fue a 50°C, siendo este agar el con menor contenido de sulfato y la extracción a 80°C que tuvo el menor rendimiento corresponde al agar con mayor contenido de sulfato. Esto concuerda con la teoría, ya que, con la extracción busca recuperar la fracción neutra del agar, y al tener un menor contenido de sulfatos, se recupera más producto.

Comparando los resultados de la caracterización entre agarosas, se pudo apreciar una diferencia en la apariencia del producto, tanto en su forma seca, como en estado de gel, estos muestran que el aumento de temperatura disminuye la intensidad del color, siendo la agarosa extraída a 80°C la de mejor apariencia, a pesar de ser la que mostró un mayor contenido de sulfatos. Con esto se puede concluir que la temperatura de extracción tiene un efecto en los pigmentos presentes en la agarosa,

lo cual es importante para conseguir un producto atractivo comercialmente, ya que las agarosas comerciales son blancas en forma de polvo y cuasi transparentes en forma de gel.

Por otro lado, los resultados del análisis con FTIR, mostraron que todas las agarosas obtenidas tienen espectros de absorción muy similares y una similitud con la librería de un 81% hasta 89,5% correspondientes a la agarosa extraída a 70°C y 60°C respectivamente, mientras la agarosa comercial reportó 92% de similitud. Con respecto al contenido de sulfatos no existieron diferencias significativas entre las agarosas, estando en un rango del 0,16% al 0,20%, mientras la agarosa comercial contenía un 0,11%, mostrando diferencias significativas, sin embargo, se encuentran en un rango aceptable para agarosas comercializadas para electroforesis.

Las temperaturas de gelificación exhibidas por los geles de agarosa a una concentración de 1,5% p/v, no mostraron diferencias significativas entre agarosas, ni con la agarosa comercial analizada, encontrándose en un rango entre 30 y 34°C. Se puede concluir que la temperatura de gelificación de las agarosas extraídas es comparable con la de la agarosa comercial. Por otro lado, la temperatura de fusión tampoco mostró diferencias significativas entre las agarosas, encontrándose en un rango entre 76 y 79°C, mientras la agarosa comercial tuvo una temperatura de fusión de 82°C, siendo comparable solo a la agarosa extraída a 50°C.

La fuerza de gel exhibida por los productos obtenidos se encuentra en un rango de 642 a 483 g/cm<sup>2</sup>, siendo la agarosa extraída a 50°C la que mostró una mayor fuerza de gel. Si bien se observaron grandes diferencias significativas al comparar las agarosas obtenidas con la agarosa comercial estudiada, estas presentan una fuerza de gel mayor a la reportada para productos comercializados y los cuales permiten un buen manejo, por lo que se puede concluir que la agarosa extraída desde *G. chilensis* mediante precipitación con polietilenglicol sería un producto comercialmente atractivo.

En la idoneidad para la electroforesis se pudo apreciar una diferencia en el comportamiento de las agarosas, asociado con el contenido de sulfatos de cada muestra, siendo la de 50°C la que mostró un mejor rendimiento con bandas más claras en el gel y un desplazamiento de los fragmentos más cercano a lo observado para la agarosa comercial.

Finalmente se concluye que en este estudio la mejor temperatura de extracción fue de 50°C, debido a que la agarosa extraída a esta temperatura fue la que presentó propiedades más cercanas a la agarosa comercial estudiada, teniendo una mayor fuerza de gel, mejor desempeño en electroforesis y un mayor rendimiento.

Al analizar todas estas características, se puede ver que las agarosas obtenidas mostraron ser muy similares entre sí, a pesar de provenir de agaros de diferente calidad, lo que puede ser un indicador de que este procedimiento logra agarosas de calidad aceptable, al coincidir con las características de los productos comerciales, a partir de agaros de diferente pureza. Así esta metodología de extracción de agarosa mediante precipitación con polietilenglicol muestra resultados prometedores para ser incorporada en un proceso de biorrefinería algal de *Gracilaria chilensis*, logrando obtener un producto de alto valor agregado, que aumente el valor asociado a la producción de esta alga importante comercialmente para Chile, fomentando su cultivo y utilización.

## 5.1. Recomendaciones

Con la realización de este trabajo surge como recomendación realizar este mismo estudio a partir de un mismo lote de agar de *G. chilensis*, o de diferentes lotes homogéneos, para poder visualizar claramente el efecto de la temperatura en las propiedades de la agarosa obtenida.

Junto con esto se sugiere triturar bien el alga seca para mejorar el rendimiento en la extracción de agar. También se recomienda establecer tiempos fijos en la etapa de secado de las algas, agar y agarosas, para que el contenido de agua no sea una variable dentro de la experimentación, ya que, si bien se buscó peso constante, hubo diferentes tiempos de secado, que pudieron afectar la calidad del producto, ya que el agua interfiere en mediciones como por ejemplo en el análisis mediante FTIR. En esta misma línea, se recomienda el uso de un equipo de liofilización para el secado de agar y agarosa, debido a que se obtienen productos con mejor disolución.

Se propone realizar un estudio a las diferentes fases del precipitado que se obtiene en la centrifugación en caliente después de la precipitación con PEG, para saber si la fase gel, de la cual se perdía una porción, corresponde o no a agarosa y con esto, si es que debe retenerse o desecharse. También se sugiere el ajuste de las condiciones de centrifugación, debido a que este dato no fue encontrado y se optó por una velocidad, temperatura y tiempo arbitrarios, basado en experiencias con otros procesos, por lo que esta etapa puede ser mejorada considerablemente, para obtener un pellet más compacto y que sea más homogéneo, evitando la pérdida de parte del precipitado.

Para la extracción de agarosa utilizando polietilenglicol se recomienda hacer un estudio del efecto de la concentración de este en el proceso, debido a que se reporta que diferentes concentraciones de PEG precipitarían diferentes pesos moleculares de agarosa, las cuales poseen propiedades diferentes. También se sugiere estudiar una segunda e incluso una tercera etapa de precipitación PEG, al disolver el pellet obtenido en la primera etapa, con el fin de lograr una agarosa más purificada.

Para hacer más robusta la caracterización de las agarosas extraídas, se sugiere realizar los análisis con FTIR en triplicado, para poder obtener más confianza en los resultados, debido a que diversos factores pueden afectar la medición, como la forma y tamaño de la muestra. Adicionalmente se sugiere realizar un análisis exhaustivo de los espectros infrarrojos reportados en esta medición, con el apoyo de un asesor con experiencia en análisis de este tipo de ensayos, para poder detectar las estructuras químicas presentes causantes de las diferencias entre los productos obtenidos.

Con el mismo objetivo de mejorar la caracterización, se sugiere utilizar un aparato de punto de fusión para determinar la temperatura de fusión de los geles, obteniendo este dato con mayor confiabilidad al ser una metodología más exacta que la utilizada en este trabajo. Finalmente se recomienda incluir la medición de otras características, como el contenido de 3,6-anhidrogalaactosa, ya que, esta se relaciona directamente con la calidad de la agarosa y su fuerza de gel. También se considera importante conocer el valor de la electroosmosis, ya que se relaciona con su comportamiento en electroforesis. Ambas propiedades son constantemente reportadas en los catálogos comerciales y pueden ayudar a clasificar el producto obtenido para aplicaciones específicas.

# Bibliografía

- [1] A. J. Gabric, "The Climate Change Crisis: A Review of Its Causes and Possible Responses", *Atmosphere (Basel)*, vol. 14, n° 7, 2023, doi: 10.3390/atmos14071081.
- [2] L. Chen *et al.*, "Strategies to achieve a carbon neutral society: a review", *Environ Chem Lett*, vol. 20, n° 4, pp. 2277-2310, 2022, doi: 10.1007/s10311-022-01435-8.
- [3] M. Farghali, I. M. A. Mohamed, A. I. Osman, y D. W. Rooney, "Seaweed for climate mitigation, wastewater treatment, bioenergy, bioplastic, biochar, food, pharmaceuticals, and cosmetics: a review", *Environ Chem Lett*, vol. 21, n° 1, pp. 97-152, 2023, doi: 10.1007/s10311-022-01520-y.
- [4] A. S. Zaky, "Introducing a Marine Biorefinery System for the Integrated Production of Biofuels, High-Value-Chemicals, and Co-Products: A Path Forward to a Sustainable Future", *Processes*, vol. 9, n° 10, 2021, doi: 10.3390/pr9101841.
- [5] A. Azapagic, "Sustainability considerations for integrated biorefineries", *Trends in Biotechnology*, vol. 32, n° 1, pp. 1-4, enero de 2014. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.10.009.
- [6] A. T. Ubando, C. B. Felix, y W. H. Chen, "Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review", *Bioresource Technology*, vol. 299. Elsevier Ltd, 1 de marzo de 2020. doi: 10.1016/j.biortech.2019.122585.
- [7] R. S. Baghel, "Developments in seaweed biorefinery research: A comprehensive review", *Chemical Engineering Journal*, vol. 454, p. 140177, 2023, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140177>.
- [8] J. Chi, Y.-K. Chang, y S.-K. Hong, "MINI-REVIEW Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes", doi: 10.1007/s00253-012-4023-2.
- [9] F. Ferdouse, S. L. Holdt, R. Smith, P. Murua, y Z. Yang, *The global status of seaweed production, trade and utilization*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.
- [10] J. Vergara y C. Vásquez, "Procedimientos para la instalación y operación de un cultivo de pelillo (Agarophyton chilense) - MANUAL", Santiago, 2021. Accedido: 9 de febrero de 2024. [En línea]. Disponible en: [https://www.subpesca.cl/portal/617/articles-111596\\_recurso\\_14.pdf](https://www.subpesca.cl/portal/617/articles-111596_recurso_14.pdf)
- [11] FAO - COMITÉ DE PESCA, "RECONOCIMIENTO Y MEJORA DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS ALGAS AL DESARROLLO DE LA ACUICULTURA MUNDIAL", FAO, may 2023. doi: 10.4060/cc0461es.
- [12] M. Avila *et al.*, "MANUAL DE BUENAS PRÁCTICAS PARA EL CULTIVO DEL PELILLO (Agarophyton chilensis)", 2019. Accedido: 11 de marzo de 2024. [En



- línea]. Disponible en: [https://www.sernapesca.cl/app/uploads/2023/11/manual\\_buenas\\_practicas\\_del\\_cultivo\\_de\\_pelillo.pdf](https://www.sernapesca.cl/app/uploads/2023/11/manual_buenas_practicas_del_cultivo_de_pelillo.pdf)
- [13] Subsecretaría de Pesca y Acuicultura - Gobierno de Chile, "INFORME SECTORIAL DE PESCA Y ACUICULTURA CONSOLIDADO (2021-2022)", 2022. Accedido: 11 de marzo de 2024. [En línea]. Disponible en: [https://www.subpesca.cl/portal/618/articles-117958\\_documento.pdf](https://www.subpesca.cl/portal/618/articles-117958_documento.pdf)
- [14] S. Brain-Isasi, S. Correa, J. Amado-Hinojosa, A. H. Buschmann, C. Camus, y M. E. Lienqueo, "Combined extraction methodology for simultaneous recovery of phyco-biliproteins and agar from the red alga *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira", *Algal Res*, vol. 67, p. 102821, sep. 2022, doi: 10.1016/J.AL-GAL.2022.102821.
- [15] M. Álvarez-Viñas, N. Flórez-Fernández, M. D. Torres, y H. Domínguez, "marine drugs Successful Approaches for a Red Seaweed Biorefinery", 2019, doi: 10.3390/md17110620.
- [16] D. J. McHugh, "Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds - CHAPTER 1: PRODUCTION, PROPERTIES AND USES OF AGAR", Rome, 1987. Accedido: 27 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/x5822e/x5822e03.htm>
- [17] K. W. Chew, J. C. Juan, S. M. Phang, T. C. Ling, y P. L. Show, "An overview on the development of conventional and alternative extractive methods for the purification of agarose from seaweed", *Sep Sci Technol*, vol. 53, nº 3, pp. 467-480, feb. 2018, doi: 10.1080/01496395.2017.1394881.
- [18] A. Polson, "Fractionation of mixtures of agarose and agaropectin", 3335127, 8 de agosto de 1967 Accedido: 27 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://patents.google.com/patent/US3335127A/en>
- [19] R. Cubillos, "EL AGAR-AGAR CHILENO", *Revista de Biología Marina*, pp. 70-88, 1951. Accedido: 27 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: <https://rbmo.uv.cl/escaneados/3-70.pdf>
- [20] W. K. Lee, Y. Y. Lim, A. T. C. Leow, P. Namasivayam, J. Ong Abdullah, y C. L. Ho, "Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review", *Carbohydr Polym*, vol. 164, pp. 23-30, may 2017, doi: 10.1016/J.CARBPOL.2017.01.078.
- [21] Z. Belattmania *et al.*, "Gracilaria gracilis (Gracilariales, rhodophyta) from dakhla (southern moroccan atlantic coast) as source of agar: Content, chemical characteristics, and gelling properties", *Mar Drugs*, vol. 19, nº 12, dic. 2021, doi: 10.3390/md19120672.
- [22] E. Andrés Montilla-Escudero *et al.*, "EFECTO DEL TRATAMIENTO ALCALINO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD Y LAS PROPIEDADES FÍSICAS DEL AGAR-AGAR

PROVENIENTE DE GRACILARIA VERRUCOSA”, Accedido: 27 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-97612011000100005&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612011000100005&lng=en&tlng=es)

- [23] Y. Zhang, X. Fu, D. Duan, J. Xu, y X. Gao, “Preparation and characterization of agar, agarose, and agarpectin from the red alga *Ahnfeltia plicata*”, *J Oceanol Limnol*, vol. 37, n° 3, pp. 815–824, may 2019, doi: 10.1007/S00343-019-8129-6/METRICS.
- [24] E. Marinho-Soriano, “Agar polysaccharides from *Gracilaria* species (Rhodophyta, Gracilariaceae)”, *J Biotechnol*, vol. 89, n° 1, pp. 81–84, 2001, doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00255-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00255-3).
- [25] C. Tello-Ireland, R. Lemus-Mondaca, A. Vega-Gálvez, J. López, y K. Di Scala, “Influence of hot-air temperature on drying kinetics, functional properties, colour, phycobiliproteins, antioxidant capacity, texture and agar yield of alga *Gracilaria chilensis*”, *LWT - Food Science and Technology*, vol. 44, n° 10, pp. 2112–2118, dic. 2011, doi: 10.1016/J.LWT.2011.06.008.
- [26] B. Matsuhira y C. C. Urzúa, “Agars from *Gracilaria chilensis* (Gracilariales)”, *J Appl Phycol*, vol. 2, n° 3, pp. 273–279, 1990, doi: 10.1007/BF02179785.
- [27] M. Duckworth y W. Yaphe, “Preparation of agarose by fractionation from the spectrum of polysaccharides in agar”, *Anal Biochem*, vol. 44, n° 2, pp. 636–641, dic. 1971, doi: 10.1016/0003-2697(71)90253-3.
- [28] B&V srl, “WHAT IS AGAR”, <https://www.agar.com/en/about-agar-agar>.
- [29] AcademiaLab, “Agarosa”, <https://academia-lab.com/enciclopedia/agarosa/>.
- [30] K. Alba y V. Kontogiorgos, “Seaweed Polysaccharides (Agar, Alginate Carrageenan)”, en *Encyclopedia of Food Chemistry*, L. Melton, F. Shahidi, y P. Varelis, Eds., Oxford: Academic Press, 2019, pp. 240–250. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21587-4>.
- [31] C. Zhang *et al.*, “Convenient Agarose Preparation with Hydrogen Peroxide and Desulfation Process Analysis”, *Mar Drugs*, vol. 19, n° 6, 2021, doi: 10.3390/md19060297.
- [32] D. A. y/o sus filiales. Merck KGaA, “Agarose”, <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/substance/agarose123459012366>.
- [33] Fermelo Biotec, “Agarosa Lafken LM”, <https://fermelo.cl/tienda/marcas/fermelo-biotec/agarosa-lafken-lm/>.
- [34] J. Chen, S. K. Spear, J. G. Huddleston, y R. D. Rogers, “Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media”, *Green Chem.*, vol. 7, n° 2, pp. 64–82, 2005, doi: 10.1039/B413546F.

- [35] T. Hong, J.-Y. Yin, S.-P. Nie, y M.-Y. Xie, "Applications of infrared spectroscopy in polysaccharide structural analysis: Progress, challenge and perspective", *Food Chem X*, vol. 12, p. 100168, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100168>.
- [36] C. Rochas, M. Lahaye, y W. Yaphe, "Sulfate Content of Carrageenan and Agar Determined by Infrared Spectroscopy", vol. 29, n° 4, pp. 335-340, 1986, doi: [doi:10.1515/botm.1986.29.4.335](https://doi.org/10.1515/botm.1986.29.4.335).
- [37] A. Kumar, M. Khandelwal, S. K. Gupta, V. Kumar, y R. Rani, "Chapter 6 - Fourier transform infrared spectroscopy: Data interpretation and applications in structure elucidation and analysis of small molecules and nanostructures", en *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*, G. Misra, Ed., Academic Press, 2019, pp. 77-96. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816548-5.00006-X>.
- [38] M. Lahaye, J. F. Revol, C. Rochas, J. McLachlan, y W. Yaphe, "The Chemical Structure of *Gracilaria crassissima* (P. et H. Crouan in Schramm et Mazé) P. et H. Crouan in Schramm et Mazé and *G. tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) Cell-Wall Polysaccharides", vol. 31, n° 6, pp. 491-502, 1988, doi: [doi:10.1515/botm.1988.31.6.491](https://doi.org/10.1515/botm.1988.31.6.491).
- [39] G. Yu *et al.*, "Extraction, isolation and structural characterization of polysaccharides from a red alga *Gloiopeltis furcata*", *Journal of Ocean University of China*, vol. 9, n° 2, pp. 193-197, 2010, doi: [10.1007/s11802-010-0193-7](https://doi.org/10.1007/s11802-010-0193-7).
- [40] B. Russell, T. H. Mead, y A. Polson, "A method of preparing agarose", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 86, n° 1, pp. 169-174, 1964, doi: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(64\)90171-0](https://doi.org/10.1016/0304-4165(64)90171-0).

# Anexo A: Materiales y equipos

## A.1. Extracción de agar

### Materiales

- *Agarophyton chilensis* cultivada en Puerto Montt, recolectada en noviembre de 2022.
- Agua destilada
- NaOH al 3% p/v
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0.025% v/v
- Gasa
- Vaso precipitado 500 [ml]
- Matraces aforados 100 y 500 [ml]
- Micropipeta 1000[μg]
- Puntas de micropipeta

### Equipos

- Balanza
- Licuadora
- Congelador
- Estufa
- Parrilla de agitación con calentador

## A.2. Extracción de agarosa

### Materiales

- Agar extraído desde *A. chilensis*
- Agua destilada
- NaCl 0.05 M
- NaCl 0.1 M
- PEG 6000
- Etanol 70%
- Gasa
- Vaso precipitado 600 ml
- Agitador magnético con calentador
- Micropipeta p1000
- Micropipeta p 5000
- Puntas de micropipeta

## Equipos

- Estufa
- Congelador
- Agitador magnético con calentador
- Centrifuga 5804 R - Eppendorf

## A.3. Caracterización propiedades fisicoquímicas

### A.3.1. Temperatura fusión y gelificación

#### Materiales

- Agar extraído desde *A. chilensis*
- Agar comercial: Difco™ Bacto Agar – BD (Chile)
- Agarosa de *A. chilensis*
- Agarosa comercial: “SeaKem® LE Agarosa”- Lonza (USA)
- Agua destilada
- Tubo de ensayo de vidrio
- Bolita de vidrio de 3 mm diámetro
- Frascos tapa rosca azul 25 ml
- Termómetro

#### Equipos

- Autoclave
- Baño maría

### A.3.2. Medición fuerza de gel

#### Materiales

- Agarosa de *A. chilensis*
- Agarosa comercial: “SeaKem® LE Agarose”- Lonza (USA)
- Agar comercial: Difco™ Bacto Agar – BD (Chile)
- Agua destilada
- Tubos plásticos de 3,8 cm de diámetro
- Embolo cilíndrico de 1,27 cm de diámetro

## Equipos

- Texturómetro Zwick Roell BDO-FBO
- Autoclave

### A.3.3. Medición de sulfatos

#### Materiales

- Gelatina en polvo
- Agar extraído desde *A. chilensis*
- Agar comercial: Difco™ Bacto Agar – BD (Chile)
- Agarosa de *A. chilensis*
- Agarosa comercial: “SeaKem® LE Agarosa”- Lonza (USA)
- Agua ultrapura
- Cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ )
- Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )
- HCl 0.5 M
- Microtubos 1.5 ml
- Tubos Falcón 50 ml
- Microplaca 96 pocillos
- Micropipeta multicanal P200
- Micropipeta P20
- Puntas de micropipeta

## Equipos

- Centrifuga 5804 R - Eppendorf
- Vortex
- Espectrofotómetro, SPECTROstar Omega
- Baño seco

### A.3.4. Electroforesis

#### Materiales

- Agarosa de *A. chilensis*
- Cámara electroforesis
- Buffer TAE x1
- Estándar de ADN 1 Kb
- Tinción ácidos nucleicos, GelRed®
- Micropipeta P2
- Molde para gel de electroforesis
- Puntas de micropipeta

## Equipos

- Autoclave
- Voltímetro
- Generador de imágenes, Gel Doc™ EZ Imager

# Anexo B: Base de datos resultados

A continuación, se proporciona un enlace de una carpeta almacenada en Drive, llamada “Resultados Memoria - Maria Trujillo”, donde se recopilan todos los datos obtenidos en el desarrollo del trabajo experimental. Aquí se podrán encontrar los datos crudos, reportes y datos procesados de los resultados de:

- Rendimiento extracción de agarosas
- Temperatura gelificación y fusión
- Contenido de sulfatos
- Análisis FTIR
- Mediciones reológicas
- Fuerza de gel
- Electroforesis
- Análisis estadístico ANOVA

El enlace a la carpeta de Drive es el siguiente: [https://drive.google.com/drive/folders/1SDqN9XoZL7a4m7\\_qXT0IZIRMrojPqFS2?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1SDqN9XoZL7a4m7_qXT0IZIRMrojPqFS2?usp=sharing)



## Anexo C: Cálculo rendimiento agarosa

La extracción de agarosa se realizó desde 1,2 g de agar extraído desde *A. chilensis*, lo que va a representar el 100% de la muestra. Una vez realizada toda la metodología de extracción, la agarosa obtenida es pesada para saber qué porcentaje de la muestra inicial es recuperada. A continuación, se ejemplificará el cálculo de rendimiento con los datos obtenidos de la extracción a 50°C, mostrados en la Tabla 3, el cual se realizó en la herramienta computacional Excel.

Tabla 3: Masa de agarosa obtenida en la extracción a 50°C, realizada en triplicado.

Muestra	Peso [g]
1	0,73
2	0,75
3	0,76
<b>Promedio</b>	<b>0,75</b>
<b>Desv. estándar</b>	<b>0,02</b>

Primero se calcula el peso promedio de la agarosa extraída en triplicado, con la función “PROMEDIO”, seleccionando las celdas correspondientes al peso de M1, M2 y M3, se calcula un promedio simple, sumando los valores y dividiendo esta suma en el número de datos, en este caso se muestra redondeado resultando 0,75. Luego se calcula la desviación estándar de los datos del peso con la función “DESVESTA”.

Finalmente, para el cálculo del porcentaje, se divide el peso promedio por 1,2, que corresponde al peso inicial de la muestra, y se multiplica por 100 para expresarlo en porcentaje. Se realiza la misma operación para expresar la desviación estándar en términos de porcentaje.

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso}_{\text{promedio}}}{\text{peso}_{\text{inicial}}} * 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{0,7467 \text{ g}}{1,2 \text{ g}} * 100 = 62,22\%$$

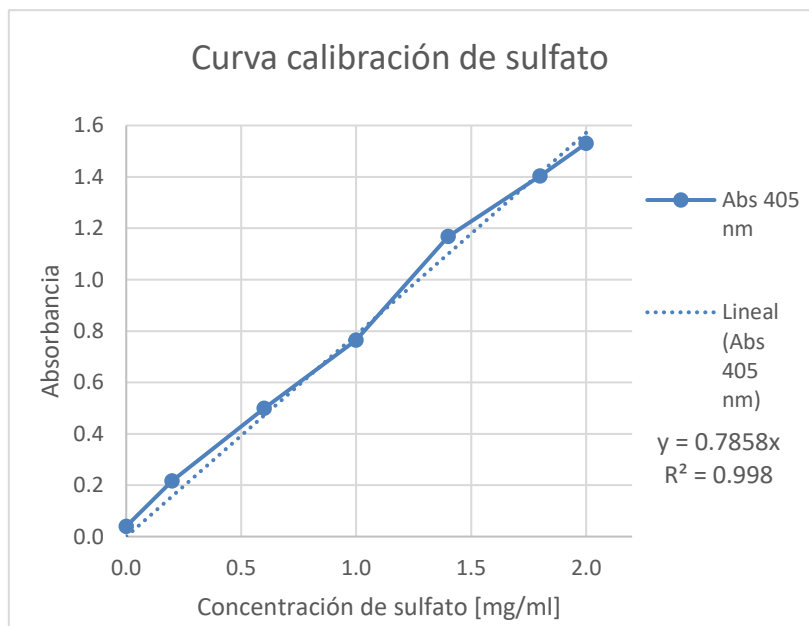
# Anexo D : Contenido de sulfato

## D.1. Curva de calibración

La curva de calibración se realizó con la sal sulfato de sodio en concentraciones conocidas entre 0,2 y 2,0 mg/ml. Se calculo el promedio de las tres mediciones de absorbancia para relacionar una absorbancia con cada concentración conocida, lo cual se muestra en la Tabla 4. Con estos datos se crea un gráfico de dispersión, mostrado en el Figura 36, donde el eje x corresponde a la concentración de sulfato y en el eje y la absorbancia.

Tabla 4: Datos curva de calibración contenido de sulfatos.

Concentración (mg/ml)	Absorbancia 405 (nm)
0,0	0,040
0,2	0,216
0,6	0,499
1,0	0,765
1,4	1,169
1,8	1,403
2,0	1,530



Una vez creado el gráfico se añade una línea de tendencia, línea punteada en la Figura 36, la cual está representada por la ecuación de la recta, mostrada en la figura. Con esta ecuación se puede relacionar cada absorbancia medida en las muestras analizadas con la concentración correspondiente. El valor de  $R^2$ , 0,998, muestra que esta curva se ajusta fidedignamente a los puntos experimentales.

Figura 36: Curva de calibración contenido de sulfato, realizada con un estándar de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  con concentraciones entre 0,2 mg/ml y 2 mg/ml.

## D.2. Porcentaje de sulfato

La medición de la concentración de sulfatos en las muestras de agar y agarosa se realizaron en triplicado mediante la lectura de la absorbancia a 405 nm. Una vez seguida la metodología, se calculó la absorbancia promedio correspondiente a cada muestra y usando ecuación de la línea de tendencia de la curva de calibración, se despeja la concentración de sulfatos. A continuación, se ejemplifica este cálculo con la muestra de agarosa extraída a 50°C.

Las tres mediciones de absorbancia de esta muestra fueron: 0,054 - 0,060 - 0,072. Se calcula el promedio simple, que es 0,062. Luego usando la ecuación de la curva de la línea de tendencia,  $y = 0,7858x$ , donde la absorbancia promedio corresponde a la variable “y”, se despeja el valor de “x”, que corresponde a la concentración de sulfatos.

$$absorbancia_{promedio} = 0,7858 * Concentración_{sulfatos}$$

$$y = 0,7858 * x$$

$$x = \frac{0,062}{0,7858} = 0,079 \frac{mg}{ml}$$

Una vez calculada la concentración de sulfatos promedio de esta muestra, que corresponde a 0,079 mg/ml, se debe calcular el porcentaje que este valor representa de la muestra inicial. Para esto se considera que la muestra medida tenía un volumen de 0,02 ml, pudiendo conocer el peso del sulfato en esta muestra multiplicando estos valores.

$$masa\ sulfato = 0,079 \frac{mg}{ml} * 0,02\ ml = 0,0016\ mg$$

Luego se calcula el porcentaje que esta masa de sulfato representa del total de la muestra, que fue de 1 mg.

$$Porcentaje_{sulfato} = \frac{0,0016\ mg}{1\ mg} * 100 = 0,16\%$$

# Anexo E: Resultados FTIR

## E.1. Porcentajes similitud compuestos librerías

La Tabla 5 muestra con mayor detalle los porcentajes de similitud reportados en los resultados del análisis mediante FTIR, incluye los 3 compuestos más similares y su número identificador en la librería.

*Tabla 5: Porcentajes similitud muestras de agar de G. chilensis y agarosas extraídas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas, con compuestos de las librerías FTIR. Se indica entre corchetes el número identificador del compuesto.*

Muestra	Porcentaje similitud		
	Agar, commercial, (w absorbed water) [343]	Agarosa, (w absorbed water), Sigma [344]	Agar, fine powder [1171]
Agar 50°C	68,21%	68,23%	82,57%
Agarosa 50°C	90,33%	89,02%	88,55%
Agar 60°C	95,38%	92,72%	87,70%
Agarosa 60°C	90,48%	89,54%	86,65%
Agar 70°C	66,52%	64,54%	82,49%
Agarosa 70°C	81,36%	80,94%	83,57%
Agar 80°C	55,82%	53,83%	75,14%
Agarosa 80°C	87,09%	86,65%	86,46%
Agar comercial	88,93%	86,95%	85,98%
Agarosa comercial	93,54%	92,83%	88,03%

## E.2. Comparación espectros FTIR agar y agarosas

A continuación, las Figuras 37, 38, 39 y 40 muestran gráficos donde se puede apreciar el espectro FTIR de la agarosa extraída a una temperatura y el respectivo agar del cual se extrajo. Estas figuras ayudan a identificar las diferencias en la composición química que se generan luego de aplicar la metodología de precipitación con PEG.

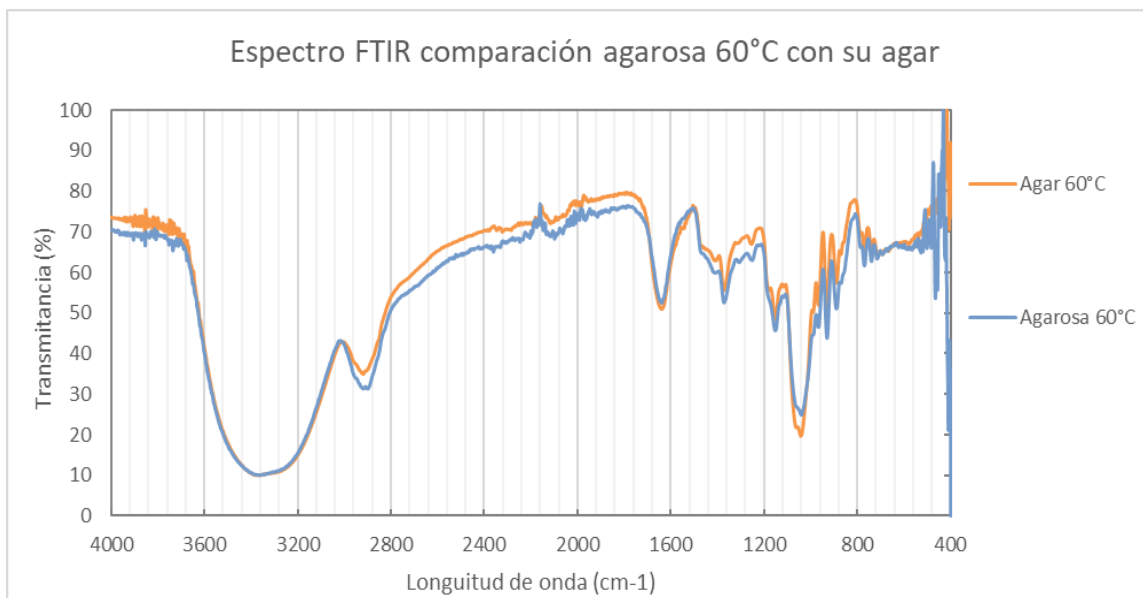


Figura 37: Espectros FTIR de la agarosa extraída a 60°C mediante precipitación con PEG y del agar del cual fue extraído

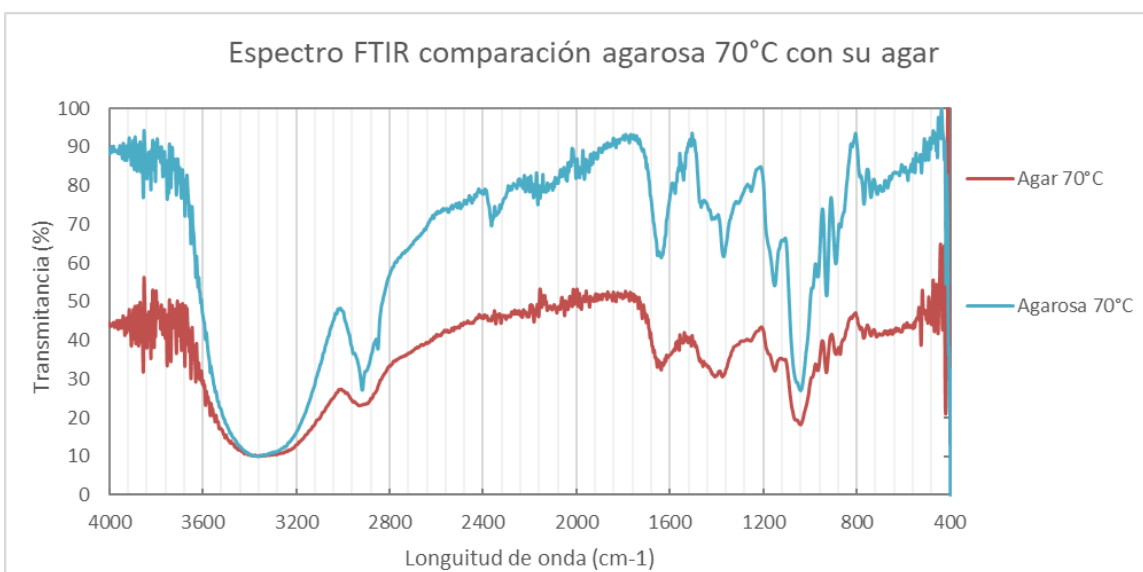


Figura 38: Espectros FTIR de la agarosa extraída a 70°C mediante precipitación con PEG y del agar del cual fue extraído

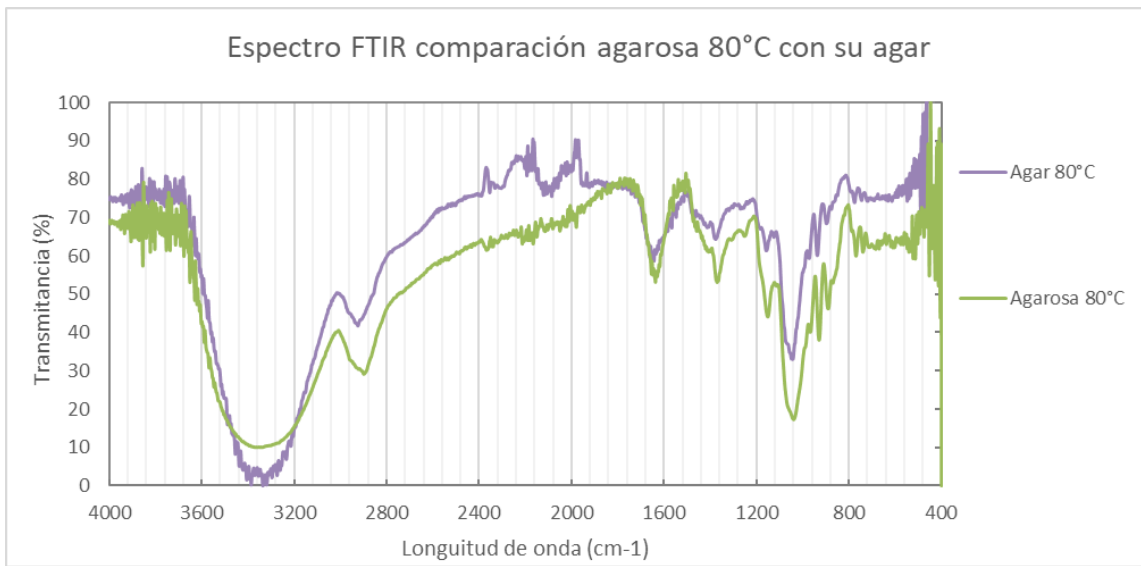


Figura 39: Espectros FTIR de la agarosa extraída a 80°C mediante precipitación con PEG y del agar del cual fue extraído.

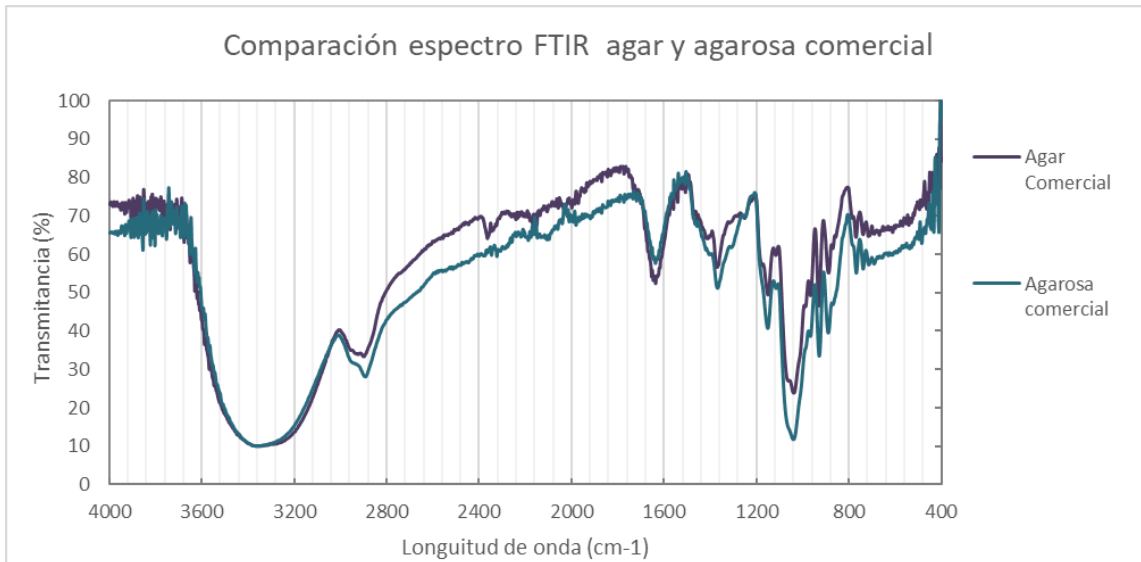


Figura 40: Espectros FTIR de la agarosa y agar comerciales.

# Anexo F: Resultados temperatura de gelificación y fusión

A continuación, la Tabla 6, muestra el detalle de las temperaturas de gelificación y fusión promedio de los geles de agar y agarosa a una concentración de 1,5% p/v. También se muestra la desviación estándar de los datos registrados.

*Tabla 6: Temperaturas de gelificación y fusión promedio de los geles de agar extraído de A. chilensis y las agarosas obtenidas mediante precipitación con PEG a diferentes temperaturas. Geles formados con una concentración de 1,5% p/v.*

Muestra	T gelificación (°C)	T fusión (°C)
Agar comercial	30,5 ± 0,7	81,5 ± 0,7
Agarosa comercial	31,0 ± 1,4	82,5 ± 3,5
Agar 50°C	29,5 ± 0,7	72,5 ± 0,7
Agarosa 50°C	31,3 ± 0,6	78,3 ± 0,5
Agar 60°C	29,5 ± 0,7	72,5 ± 2,1
Agarosa 60°C	32,3 ± 1,5	77,3 ± 0,5
Agar 70°C	31,0 ± 0,0	74,5 ± 0,7
Agarosa 70°C	32,5 ± 0,6	77,0 ± 1,2
Agar 80°C	30,0 ± 0,0	75,0 ± 1,4
Agarosa 80°C	31,3 ± 0,6	77,9 ± 0,9

# Anexo G: Cálculo fuerza de gel

Cuando se realiza la medición con el Texturómetro, el software entrega una tabla de datos relevantes de la prueba. Entre estos datos se encuentra la fuerza máxima ( $F_{\max}$ ) aplicada por el equipo durante la medición, que corresponde también al peak generado en el gráfico de fuerza (N) versus la distancia de penetración (mm).

Se toma este dato para cada muestra, que se tiene en triplicado, se calcula el promedio y la desviación estándar en Excel y luego se convierten las unidades de medida de newton (N) a  $\text{g}/\text{cm}^2$ , para esto se sigue el procedimiento descrito a continuación, el cual se ejemplificará con los datos obtenidos para la agarosa extraída a  $50^\circ\text{C}$ , mostrados en la Tabla 7.

Tabla 7: Datos de fuerza máxima obtenidos en la medición de la fuerza de gel para la agarosa extraída a  $50^\circ\text{C}$ .

Medición	$F_{\max}$ (N)
1	7,74
2	8,42
3	7,76
<b>Promedio</b>	7,97
<b>Desv. estándar</b>	0,32

Tomamos el promedio de  $F_{\max}$  obtenido y se convierten sus unidades de newton a gramos, para eso dividimos por la fuerza de gravedad y luego pasamos de Kg a g multiplicando por mil.

$$\frac{F_{\max} \text{ promedio}}{\text{Fuerza de gravedad}} = \frac{7,97 \text{ N}}{9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}} = \frac{7,97 \frac{\text{Kg} \times \text{m}}{\text{s}^2}}{9,81 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}} = 0,81234 \text{ Kg} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ Kg}} = 812,43 \text{ g}$$

Luego se dividen estos gramos equivalentes a la fuerza aplicada en el área de contacto del embolo utilizado expresado en  $\text{cm}^2$ , que en este caso tenía una forma cilíndrica y un diámetro de 1,27 cm, por lo que se calcula área de un círculo.

$$\text{Área} = \pi \times \left(\frac{\text{diámetro}}{2}\right)^2 = 3,14 \times \left(\frac{1,27 \text{ cm}}{2}\right)^2 = 1,2668 \text{ cm}^2$$

Finalmente, con estos dos valores expresamos la fuerza de gel de la agarosa extraída a  $50^\circ\text{C}$  en  $\text{g}/\text{cm}^2$ .

$$\text{Fuerza de gel} = \frac{812,43 \text{ g}}{1,2668 \text{ cm}^2} = 641,82 \frac{\text{g}}{\text{cm}^2}$$

Se sigue el mismo procedimiento para el valor promedio de la desviación estándar. Que en este caso resulta ser  $25,43 \text{ g}/\text{cm}^2$ .