



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Estudio del sistema de polisacáridos del alga  
parda *Dictyota dichotoma* y su actividad  
antiviral**

Melissa Rabanal Atalaya

Director de tesis

Dr. Ricardo M. Gómez

Co-Director de Tesis

Dr. Carlos A. Stortz

2015

A Víctor y Andrea, mis padres

A Emanuel, mi hijo

## **Agradecimientos**

A Dios por haberme permitido cumplir una meta que me propuse cuando tenía 14 años.

A mis padres, porque son lo más importante que tengo, porque sin ellos no hubiera sido posible terminar mi tesis doctoral, por su paciencia y apoyo incondicional. Además, agradezco a mis primas Claudia, Gisela, Erika, Milagros, Elizabeth, Patricia, Chiara, a mis tías Pura, Sara, Ninfa, Margarita, Sofía, Elva, a mis tíos Amado y Carlos y a mis hermanos Walter y Grover por su apoyo, consejos, aliento y ánimo constante.

Al Dr. Carlos A. Stortz, Director de mi beca doctoral, le agradezco por haberme aceptado trabajar en su laboratorio, por su aporte científico, sus enseñanzas y por estar siempre predisposto a responderme, escucharme y ayudarme.

Al Dr. Ricardo M. Gómez, por la ayuda con los ensayos antivirales contra los virus Herpes y Coxsackie y por haberme aconsejado y ayudado en mi tesis.

Al Dr. Diego A. Navarro, mi superior directo, por haberme tenido paciencia, por su dedicación constante, ayuda, por ser tan buena persona, compañero y amigo y a la Dra. Andrea Ponce, por haberme ayudado al inicio de mi tesis y por haber leído minuciosamente mis textos.

A mi compañera de laboratorio, Vanina Cosenza por haberme enseñado algunas cosas del laboratorio, por su compañerismo y por ser buena persona. A mi compañera de L6, Mercedes Pérez, por sus charlas más allá de la química y también a mis amigas, Jaymin, Tamara y Laura, por su amistad, por los tantos almuerzos agradables.

A la Dra. Cristina Matulewicz, por haberme permitido utilizar su equipamiento de su laboratorio, por su ayuda y afecto y a la Dra. Cecilia Rodriguez, por haberme ayuda y aconsejado cuando yo buscaba una beca doctoral. Además, agradezco a Marina, Virginia, Paula por haberme tratado bien en el laboratorio.

Además agradezco a las siguientes instituciones:

A CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas), perteneciente a la República Argentina, por haberme otorgado las becas tipo I y II, lo cual me permitió realizar mi tesis doctoral.

Al Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, por haberme brindado la oportunidad y el lugar de trabajo para realizar el presente trabajo de tesis.

A todas las personas que trabajan en el Departamento de Química Orgánica, FCEN-UBA, docente y no docentes, técnicos y tesisistas por recibirme y tratarme tan cordialmente.

Al Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM), por haber permitido realizar los ensayos antivirales contra el virus del Herpes Simplex 1 y Coxsackie B3. Además, agradezco a todo el personal y compañeras del laboratorio por haberme enseñado y por tratarme cordialmente.

Y a todas aquellas personas que de alguna manera colaboraron conmigo en todos estos años.

# INDICE

<b>Agradecimientos</b>	<b>ii</b>
<b>Indice</b>	<b>v</b>
<b>Objetivos</b>	<b>ix</b>
<b>Resumen</b>	<b>x</b>
<b>Capítulo 1: Introducción general</b>	
1.1. <b>Las algas</b>	2
1.2. <b>Algas pardas (Phaeophyta)</b>	3
1.2.1. Componentes polisacáridicos de la pared celular	3
1.3. <b><i>Dictyota dichotoma</i></b>	10
1.3.1. Datos taxonómicos	12
1.3.2. Datos morfológicos y reproductivos	13
1.4. <b>Análisis de pureza, homogeneidad, dispersión y fraccionamiento de los polisacáridos</b>	16
<b>Referencias</b>	20
<b>Capítulo 2: Polisacáridos de la pared celular de algas pardas</b>	
2. <b>Polisacáridos de la pared celular de algas pardas</b>	23
2.1. <b>Fucoidanos</b>	23
2.1.1. Nomenclatura	23
2.1.2. Composición	24
2.1.2.1. Pretratamiento del alga	24
2.1.2.2. Aislamiento y composición	25
2.1.2.3. Antecedentes de <i>Dictyota dichotoma</i>	33
2.1.3. Purificación de los polisacáridos	34
2.1.4. Estructura	36
2.2. <b>Ácido algínico y alginato</b>	46
2.2.1. Estructura	46
2.2.2. Formación del alginato de calcio	48
2.2.3. Aplicaciones	49
2.3. <b>Laminaranos</b>	50
2.3.1. Estructura	50
2.3.2. Antecedentes	51
<b>Referencias</b>	53

## Capítulo 3: Actividad antiviral de los fucoidanos

<b>3.1. Herpesvirus</b>	65
3.1.1. Introducción	65
3.1.2. Características estructurales	65
3.1.3. Características infectivas	66
3.1.4. Clasificación	67
<b>3.2. Herpesvirus humano 1</b>	69
3.2.1. Ciclo de replicación	70
3.2.2. Fármacos antivirales	72
<b>3.3. Coxsackievirus</b>	73
3.3.1. Introducción	73
3.3.2. Características estructurales	74
3.3.3. Características infectivas	76
3.3.4. Clasificación	77
<b>3.4. Coxsackievirus B3</b>	77
3.4.1. Ciclo de replicación	77
3.4.2. Fármacos anti CV	79
<b>3.5. Antecedentes de la actividad antiviral de los fucoidanos</b>	80
<b>3.6. Relaciones entre la estructura de los fucoidanos y la actividad antiviral</b>	83
<b>Referencias</b>	86

## Capítulo 4: Extracción y purificación de los polisacáridos

<b>4.1. Introducción</b>	90
<b>4.2. Extracción del fucoidano</b>	90
<b>4.3. Extracción del alginato de sodio</b>	99
<b>4.4. Fraccionamiento de los fucoidanos provenientes de los extractos ácidos</b>	101
4.4.1. Análisis de las fracciones de EAR	103
4.4.2. Análisis de las fracciones del extracto ácido a 70 °C (EAH)	109
<b>4.5. Ácidos urónicos</b>	116
<b>4.6. Discusión</b>	121
<b>Conclusiones</b>	128
<b>Referencias</b>	130

## Capítulo 5: Elucidación estructural de los fucoidanos

<b>5.1. Introducción</b>	134
<b>5.2. Elucidación estructural del EAR</b>	134
5.2.1. Estudios de metilación	134
5.2.1.1. Metilación de las fracciones	136

5.2.2. Desulfatación de las fracciones	145
5.2.2.1. Metilación de los productos desulfatados	150
5.2.3. Análisis por experimentos de RMN bidimensional de correlación C-H	156
<b>5.3. Discusión</b>	164
<b>Conclusiones</b>	167
<b>Referencias</b>	168

## **Capítulo 6: Estudio de la actividad antiviral de los fucoidanos**

<b>6.1 Introducción</b>	175
<b>6.2 Actividad antiviral</b>	175
6.2.1. Virus HHV1	175
6.2.2. Virus CVB3	178
<b>6.3. Discusión</b>	180
<b>Conclusiones</b>	183
<b>Referencias</b>	184

## **Capítulo 7: Parte experimental**

<b>7.1. Consideraciones generales</b>	189
<b>7.2. Obtención del material de estudio</b>	190
7.2.1. Aislamiento de los polisacáridos	190
7.2.1.1. Extracción de los polisacáridos	190
7.2.1.1.1. Extracción de los fucoidanos con HCl	190
7.2.1.1.2. Extracción de los fucoidanos con H <sub>2</sub> O	191
7.2.1.1.3. Extracción de los alginatos	191
7.2.2. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos	191
7.2.2.1. Precipitación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetrímid)	191
7.2.2.2. Cromatografía de permeación en geles	192
<b>7.3. Análisis de los extractos y fracciones: composición química cuantitativa</b>	192
7.3.1. Determinación de azúcares totales	192
7.3.2. Determinación de ácidos urónicos	193
7.3.3. Determinación cuantitativa de proteínas totales	194
7.3.4. Determinación del contenido de sulfato	194
7.3.4.1. Método turbidimétrico	194
7.3.4.2. Cromatografía iónica con detector conductimétrico	195
7.3.5. Determinación del peso molecular promedio	196
7.3.6. Determinación de azúcares componentes	197

7.3.6.1. Hidrólisis ácida	197
7.3.6.2. Preparación de los aldonitrilos peracetilados	197
7.3.6.3. Preparación de los alditoles peracetilados	198
7.3.7. Métodos de reducción del grupo carboxilo	198
7.3.7.1. Reducción con carbodiimida	198
7.3.7.2. Método del “metanol mágico”	199
7.3.8. Estudios de metilación	199
7.3.8.1. Obtención de la sal de trietilamonio de polisacárido	199
7.3.8.2. Estudios de metilación	199
7.3.9. Estudios de desulfatación	200
7.3.9.1. Obtención de la sal de piridinio del polisacárido	201
7.3.9.2. Reacción de desulfatación solvolítica asistida por microondas	201
<b>7.4. Cromatografía Gas-Líquido</b>	201
<b>7.5. Estudios de resonancia magnética nuclear</b>	202
<b>7.6. Estudios de la actividad antiviral</b>	202
7.6.1. Ensayo de actividad antiviral (CI <sub>50</sub> )	202
7.6.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> )	203
<b>Bibliografía</b>	204

## OBJETIVOS

### Objetivos Generales:

- Estudiar los polisacáridos de la pared celular del alga *Dictyota dichotoma* colectada en la provincia de Chubut, Argentina.
- Analizar posibles aplicaciones antivirales de polisacáridos extraídos de dicha fuente natural.

### Objetivos específicos:

- Extraer los polisacáridos (fucoidanos y alginatos) de la feofita *Dictyota dichotoma*.
- Analizar la composición de los extractos, purificarlos y llevar a cabo la elucidación estructural de los polisacáridos purificados.
- Evaluar la acción antiviral de los fucoidanos frente a los virus herpes simplex tipo 1 y Coxsackie B3.

## Resumen

### **El estudio del sistema de polisacáridos del alga parda *Dictyota dichotoma* y su actividad antiviral**

---

Los objetivos iniciales de este trabajo de tesis consistieron en la extracción de los polisacáridos de la feofita *Dictyota dichotoma*, el fraccionamiento y la elucidación estructural de los polisacáridos purificados, y la evaluación de sus actividades antivirales contra los virus CVB3 y HHV1.

El primer polisacárido extraído fue el fucoidano. El alga seca y molida se extrajo con etanol a temperatura ambiente y a 70 °C; seguidamente se extrajo con HCl diluido a temperatura ambiente y a 70 °C, por nueve veces consecutivamente. Sobre el residuo se extrajo el alginato con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 3% a 50 °C. Los polisacáridos provenientes de la extracción con HCl se fraccionaron a través de la precipitación con Cetrimide y posterior redisolución con concentraciones crecientes de 0,5, 1, 1,5, 2, 4 y en algunos casos de 5 M de NaCl. El estudio estructural se basó en la metilación de los polisacáridos fraccionados y en la espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional, particularmente HSQC. Además, se realizaron análisis de las fracciones purificadas sobre los virus de CVB3 y HHV1.

El fucoidano extraído a temperatura ambiente (EAR) mostró características de un polisacárido heterodisperso con respecto a la composición de monosacáridos, siendo la fucosa el principal monosacárido (36%), seguido de galactosa (23%), y proporciones más chicas de xilosa y manosa ( $\leq 18\%$ ). Además, dicho extracto mostró altas proporciones de hidratos de carbono (48%), ácidos urónicos (21%), medianas proporciones de grupos sulfato (15%) y un bajo peso molecular (6,5 KDa). Los extractos obtenidos a mayor temperatura también mostraron heterodispersión con respecto a la composición de monosacáridos, observando que conforme incrementaba la secuencia extractiva la cantidad de fucosa y galactosa disminuían, mientras que la cantidad de xilosa y manosa se incrementaban. Los análisis generales nos mostraron en todos los extractos altas proporciones de hidratos de carbono excepto en EAH9. Además, la cantidad de proteínas solubles y peso molecular y grupos sulfato disminuyeron, mientras que los ácidos urónicos incrementaban conforme se incrementaba la secuencia extractiva.

El alginato extraído exhibió una preponderancia del ácido manurónico por sobre el ácido gulurónico. Además, los análisis mostraron que parecen triadas de dihos ácidos urónicos.

El fraccionamiento con Cetrimide mostró que EAR y EAH1 tienen características de un típico galactofucano sulfatado, con cantidades muy pequeñas de otras estructuras. Conforme el fraccionamiento continuaba, a bajas redisoluciones, la cantidad de fucosa disminuía y la xilosa, manosa y ácidos urónicos se incrementaban. A medida que el fraccionamiento continuó esta tendencia predominó, la fucosa dejó de ser el monosacárido principal en la mayoría de las subfracciones en los siguientes extractos, mientras, que los manosa, xilosa y ácidos urónicos se incrementaron.

El análisis estructural de las fracciones purificadas mostraron un *core* basado en residuos de  $\rightarrow 2$ -Man-(1 $\rightarrow$  con sustituciones en O-3 o en O-6 y  $\rightarrow 6$ -Gal-(1 $\rightarrow$ , sulfatada en O-3. Además, se observó que los residuos de fucosa se encontraron enlazados en proporciones variables en C-2, C-3 y C-4, y en buena medida terminales, así como altas proporciones de ramificaciones de  $\beta$ -D-xilosa.

La acción antiviral contra el virus HHV1 en las diferentes fracciones tanto a temperatura ambiente como a 70 °C, mostró que las fracciones -0,5, con características de uronofucoidanos, presentaron la más alta actividad antiviral, seguida de las fracciones EAR-2 y EAR-4. Por otro lado, a pesar que la actividad de las fracciones obtenidas a temperatura poseían menor actividad antiviral, las fracciones EAH2-0,5, EAH4-0,5 y EAH9-0 presentaron actividades moderadas.

Con respecto al virus CVB3, los extractos de la feofita *D. dichotoma* mostraron actividades moderadas frente este virus, siendo las fracciones EAR-1,5, EAR-4 y EAH1-4, las que presentaron la mejor actividad antiviral.

Cabe señalar que la fracción EAR-4, caracterizada por presentar un fucogalactano sulfatado, mostró ser la de mayor actividad frente a ambos virus, mientras que los altos valores obtenidos de  $CC_{50}$  en todas las fracciones indican una baja citotoxicidad para los fucoidanos extraídos de *Dictyota dichotoma*.

# Capítulo 1

---

## Introducción General

---

# 1. Introducción

## 1.1. Las algas

El término “algas” se aplica a un numeroso y diverso conjunto de organismos que tienen en común poseer clorofila y la capacidad de realizar la fotosíntesis. Pueden estar formados por una célula o ser multicelulares y poseer una organización de tipo protofítica o talofítica. La inmensa mayoría vive en medio acuático y si bien algunos grupos se han adaptado a la vida aérea, siempre lo hacen en ambientes húmedos ya que dependen del agua para su reproducción<sup>1</sup>.

Existen varios caracteres para clasificar a las algas, siendo los más importantes la naturaleza de sus pigmentos fotosintéticos y la composición química de la pared celular. Una característica común a todos los tipos de algas es la presencia de clorofila *a*. Sin embargo, la presencia de otros fotopigmentos diferentes de la clorofila *a* (por ejemplo, clorofilas *b*, *c* y *d*, ficobiliproteínas, etc.) y la composición química de los productos de reserva son los que caracterizan a cada división algal en particular<sup>2</sup>.

Existe más de una clasificación disponible en la literatura. La empleada en este trabajo está basada en el trabajo de Bold y Wynne<sup>1</sup>. Se incluyen entre ellas las algas rojas (*Rhodophyta*), pardas (*Phaeophyta*), verdes (*Chlorophyta*), verde-azuladas (*Cyanophyta*), euglenoides (*Euglenophyta*), doradas (*Chrysophyta*), y diatomeas (*Bacillariophyta*), entre otras.

En la Tabla 1.1 se muestran las características más importantes de las algas que poseen pared celular. Típicamente, la pared celular de las algas pertenecientes a los *phyla* *Phaeophyta*, *Rhodophyta* y *Chlorophyta* está compuesta de un esqueleto fibrilar y de una matriz amorfa embebida. El esqueleto fibrilar más común tiene como base la celulosa. Esta puede estar reemplazada por xilanos y mananos en las *Chlorophyta*, mientras que en las *Rhodophyta*, sólo por xilanos<sup>2</sup>. En las *Phaeophyta*, la matriz embebida está compuesta predominantemente por ácido algínico o su sal (alginato), conjuntamente con un polisacárido sulfatado (generalmente fucoidano); en cambio, las *Rhodophyta* contienen una gran proporción de distintos galactanos sulfatados (ágaros, carragenanos, porfiranos, etc.). Ambas divisiones contienen grandes cantidades de polisacáridos de la matriz amorfa embebida<sup>2</sup>.

**Tabla 1.1. Características de algunas de las algas más importantes. Tabla modificada de Bold y Wynne<sup>1</sup>.**

División	Nombre común	Pigmentos	Productos de reserva	Pared celular	Flagelo
<b><i>Chlorophyta</i></b>	Algas verdes	Clorofila <i>a, b</i> ; $\alpha$ -, $\beta$ - y $\gamma$ -carotenoides y varias xantofilas.	Almidón (amilosa y amilopectina).	En muchos celulosa, hidroxiprolina glucosidada, xilanos y mananos; o ausencia de pared, en algunos casos calcificada.	Presente
<b><i>Phaeophyta</i></b>	Algas pardas	Clorofila <i>a, c</i> ; $\beta$ -carotenoide, fucoxantina y otras xantofilas.	Laminaranos y manitol.	Celulosa, ácido algínico, y polisacáridos sulfatados (fucoidanos).	Presente
<b><i>Rhodophyta</i></b>	Algas rojas	Clorofila <i>a</i> ( <i>d</i> en algunas Florideophyceae); R- y C-ficocianina, aloficocianina; R- y B-ficoeritrina; $\alpha$ y $\beta$ - carotenoides y varias xantofilas	Almidón de florideas.	Celulosa, xilanos y galactanos sulfatados, calcificación y alginatos en Corallinales.	Ausente

## 1.2. Algas pardas (*Phaeophyta*)

### 1.2.1. Componentes polisacáridicos de la pared celular

Los principales componentes de las algas son los polisacáridos, los cuales pueden ser de almacenamiento o estructurales. Los primeros son polímeros tales como el almidón o el laminarano considerados como materiales de reserva, mientras que los últimos son aquellos elementos estructurales de las paredes celulares, tejidos intercelulares y matriz mucilaginosa. Los polisacáridos sulfatados constituyen un tipo muy común de polisacárido estructural y difieren de acuerdo al tipo de alga, con detalles diferentes muchas veces dependiendo del orden, familia, género y especie<sup>3</sup>.

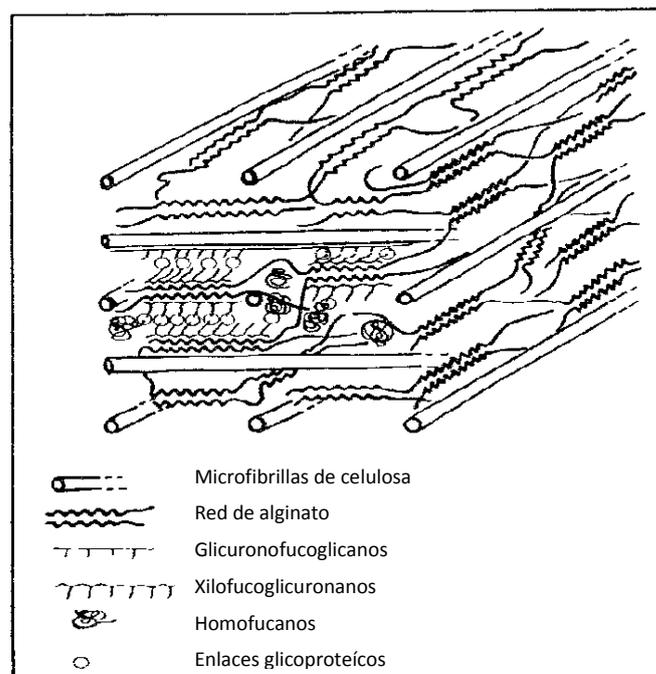
En las algas, la pared celular está compuesta de un esqueleto fibrilar inmerso en una matriz amorfa que posee dos características que la diferencian de las plantas terrestres. Una es que la matriz mucilaginosa predomina sobre la fibrilar y la otra es que hay mayor cantidad de polisacáridos cargados comparados con los polisacáridos neutros<sup>4</sup>.

La estructura química, las propiedades físicoquímicas y las actividades biológicas del ácido algínico y los fucoidanos sulfatados ya han sido estudiadas, pero la ultraestructura precisa de estas moléculas es aún desconocida, especialmente en el caso de los fucoidanos. La caracterización de la estructura fina de los polisacáridos puede contribuir a comprender la ultraestructura de la pared celular de las algas<sup>5</sup>. Existen dos modelos que intentan explicar la estructura de polisacáridos de la pared celular de las algas.

El primer modelo propone que la pared celular está compuesta por una estructura de multicapas microfibrilares de celulosa, la cual se encuentra embebida por una matriz amorfa de polisacáridos ácidos unidos entre ellos por proteínas<sup>6</sup>. Los polisacáridos ácidos están compuestos principalmente por ácido algínico o sus sales de sodio, potasio, magnesio y/o calcio y por fucoidanos sulfatados. El alginato es un copolímero lineal del ácido  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manurónico y su epímero en C-5, el ácido  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-L-gulurónico<sup>7</sup>; mientras que los fucoidanos, de acuerdo con las recomendaciones de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), se definen como polisacáridos sulfatados basados principalmente en L-fucosa sulfatada, con menos del 10% de otros monosacáridos como manosa, galactosa y xilosa. Según este modelo (Figura 1.1), las cadenas de celulosa están organizadas en microfibras cristalinas y paralelas, las cuales se ubican tangencialmente a la superficie de la célula y se entrecruzan unas con otras con ángulos poco definidos (fijados arbitrariamente en 90°). Entre las microfibras o red de microfibras, se extiende una red tridimensional continua de alginato, constituida por bloques de poliguluronato unidos por los iones calcio y más o menos enredados con cadenas de polimanuronato. Los fucanos o polisacáridos sulfatados conteniendo fucosa se pueden dividir en tres principales familias: homofucanos, xilofucoglicuronanos y glicuronofucoglicanos. Los homofucanos o fucoidanos<sup>6,8</sup>, están compuestos por cadenas de L-fucosa 4-sulfato unida  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2),

con ramificaciones o grupos sulfato en la posición 3. Pueden contener pequeñas proporciones de D-xilosa, D-galactosa y D-manosa. Los xilofucoglicuronanos o ascofilanos<sup>6,9</sup> se aíslan como complejos que contienen una porción de ácido algínico centrada en una cadena base de ácido poli  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manurónico, y una porción de fucano que contiene ramificaciones de 3-O-D-xilosil-L-fucosa 4-sulfato, y los glicuronofucoglicanos<sup>6,10</sup> que consistirían principalmente de cadenas lineales de (1 $\rightarrow$ 4)-D-galactosa, con ramificaciones en C-2 con L-fucosil 3-sulfato o en menor proporción, con un ácido urónico, probablemente ácido D-glucurónico.

Este modelo propone que los polisacáridos sulfatados conteniendo fucosa juegan un rol clave en el entrecruzamiento entre la celulosa y el alginato. Hipotéticamente, las microfibras de celulosa están firmemente unidas a los glicuronofucoglicanos (o galactanos); los alginatos están unidos a los xilofucoglicuronanos o ascofilanos por asociación espacial entre el *core* de poliurónico y las secuencias de poliguluronato. Eventualmente, las uniones entre el alginato y la celulosa podrían involucrar uniones de glicoproteínas entre las cadenas laterales del ascofilano y aquellas de glicuronofucoglicanos<sup>6</sup>. Los homofucanos (fucoidanos) podrían estar libres o como parte de un complejo supramolecular lábil al medio ácido, como el ascofilano<sup>6</sup>.



**Figura 1.1. Modelo de la estructura de la pared celular del alga parda propuesto por Kloareg y colaboradores<sup>6</sup>.**

El segundo modelo<sup>2</sup> (Figura 1.2) propone que la pared celular del alga está compuesta por dos capas diferentes: la capa interna, que consiste en un esqueleto de microfibrillas que le otorga rigidez a la pared celular, y la capa externa, que está constituida por una matriz amorfa, poco cristalina, en la cual está embebido el conjunto de microfibrillas. Existen evidencias que la matriz no penetra las fibras, sino que se mantiene unida a esta capa a través de puentes de hidrógeno. Como en el modelo anterior, la capa más interna, rígida de microfibrillas está constituida por celulosa, glucano basado de glucosa con uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) sin ramificaciones. Finalmente, el alginato contribuye a darle fuerza a la pared celular del alga parda, además de impartirle flexibilidad. Aún si el alginato está presente en la capa interna, la celulosa continúa siendo el principal componente estructural<sup>2</sup>.

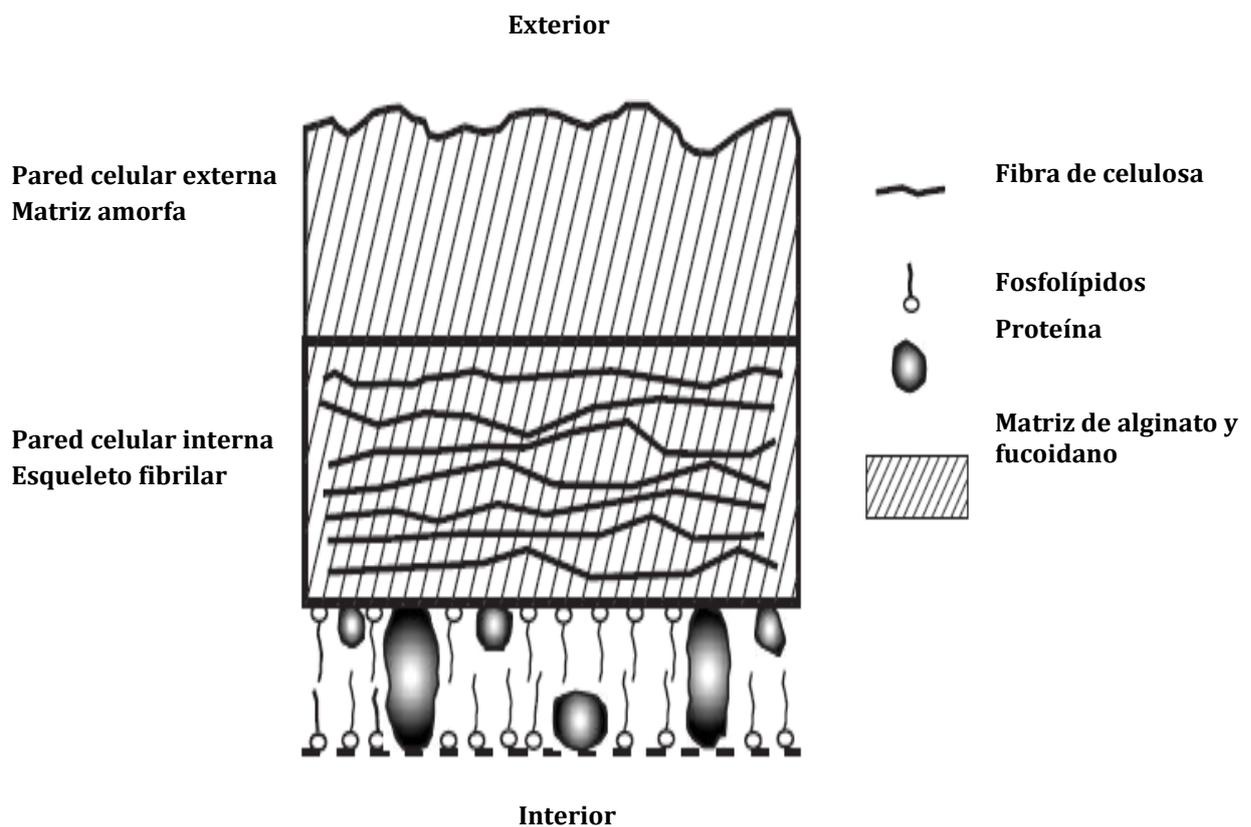


Figura 1.2. Estructura de la pared celular de algas pardas propuesta por Davis y colaboradores<sup>2</sup>.

A estos modelos se suman los estudios basados en la ultraestructura de los polisacáridos de la pared celular de las algas pardas realizados por Andrade y colaboradores usando una variedad de técnicas de microscopía electrónica<sup>5</sup>. Las observaciones de la microscopía de transmisión electrónica (TEM) de todo el polisacárido muestran numerosas estructuras en forma de bastón unidas entre ellas (Figura 1.3A). Las imágenes de difracción electrónica muestran un patrón compatible con un material policristalino (recuadro insertado en la Figura 1.3A). A su vez, la microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) muestra estructuras auto ensambladas, formando diferentes patrones laminares o trabeculares (Figura 1.3B-D). Los análisis por dispersión de energía de rayos X sugieren que el calcio y azufre están asociados a esta estructura bien organizada. Esto confirma que el ácido algínico y el fucano sulfatado se encuentran en estas estructuras trabeculares ya que los iones calcio se unen fuertemente a los grupos carboxilo del ácido algínico, mientras que los átomos de azufre son parte de los grupos sulfato de los fucanos.

Macroscópicamente, el fucano presenta forma granular, mientras que el ácido algínico presenta forma flocular<sup>5</sup>. Basándose en la propiedad que posee el ácido algínico de precipitar con el ion calcio, ambos compuestos pudieron ser analizados por TEM en forma separada.

Por un lado, los estudios del alginato mostraron que posee una estructura amorfa conteniendo numerosos poros (Figura 1.4A). La FESEM muestra que la textura es esponjosa (Figura 1.4B) con superficies con apariencia foliar (Figura 1.4C). Los poros del alginato varían entre 10 a 50  $\mu\text{m}$ . El ion determinado en el análisis fue el calcio<sup>5</sup>.

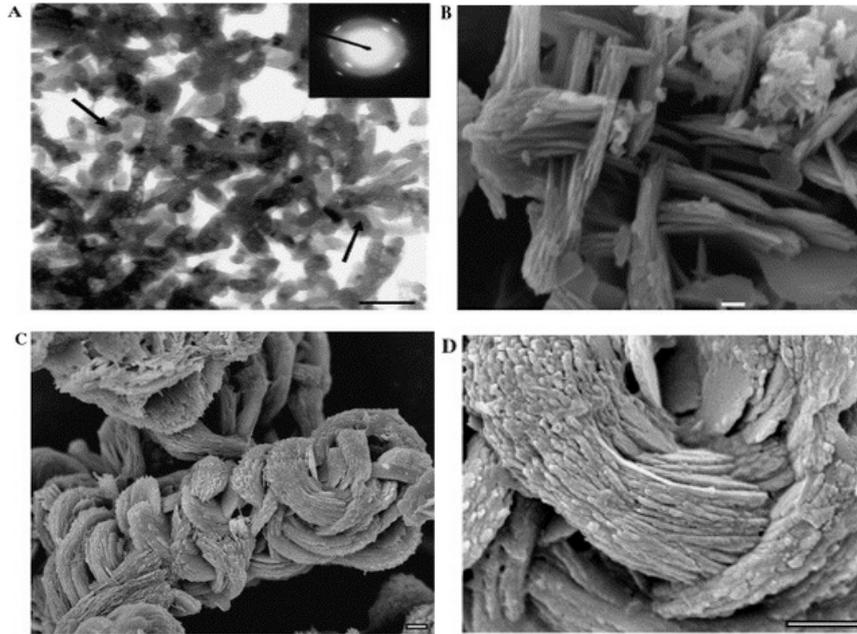


Figura 1.3. Microscopía electrónica de los polisacáridos del alga parda *Padina gymnospora*. A: TEM: las flechas muestran a los polisacáridos unidos en forma de bastón. B: FESEM del polisacárido exhibe una estructura auto ensamblada, formando diferentes patrones laminares y trabeculares. C: Imagen de FESEM de una fracción del polisacárido muestra un aspecto helicoidal. D: Vista más detallada del polisacárido que muestra una disposición en forma de placa. Figura modificada de Andrade y colaboradores<sup>5</sup>.

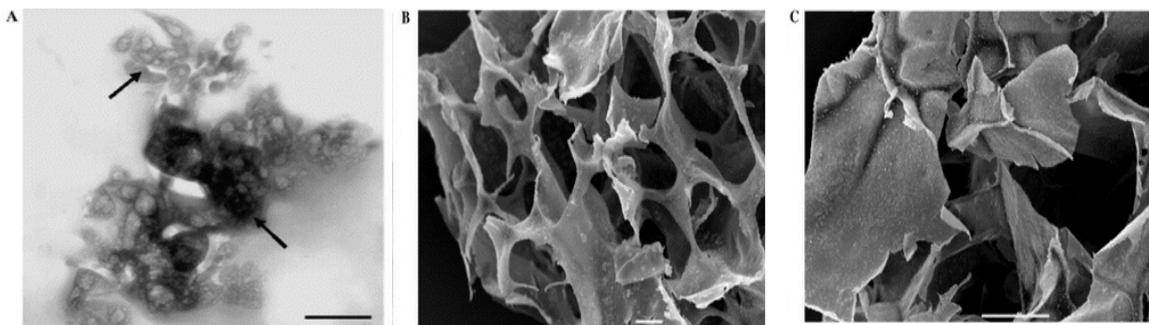


Figura 1.4. Microscopía electrónica del alginato. A: TEM: las flechas muestran estructuras amorfas conteniendo numerosos poros. B: FESEM: la forma es como una esponja. C: FESEM, superficie con apariencia foliar. Imagen modificada de Andrade y colaboradores<sup>5</sup>.

Por el contrario, el fucano sulfatado muestra numerosas partículas con proyecciones poligonales, de manera individual o en cadenas (Figura 1.5A-B). Las imágenes de difracción electrónica muestran una estructura policristalina (insertada en la Figura 1.5B). FESEM muestra numerosas partículas cúbicas de un tamaño entre 4 y 20  $\mu\text{m}$  (Figura 1.5C-D). Las imágenes de alta magnetización mostraron una discreta superficie ondulada. El azufre también fue visualizado en el fucano a través de un ensayo de EDXA (análisis de rayos-X por energía dispersiva)<sup>5</sup>.

Una explicación para esta inusual estructura de los fucanos sulfatados sería la presencia de proteínas u otras moléculas unidas a las cadenas de los polisacáridos<sup>5</sup>. Como propusieron Kloareg y colaboradores, la pared celular del alga parda está compuesta por dos componentes: celulosa y ácido algínico. Posiblemente los fucanos sulfatados<sup>11</sup> tienen un rol de entrecruzamiento entre estas dos macromoléculas. Los fucanos sulfatados y el ácido algínico presentarían ultraestructuras bien organizadas, y los patrones de organización dependerían del polisacárido<sup>11</sup>. Además, el ácido algínico muestra estructuras como una esponja con numerosos poros, mientras que el fucano sulfatado muestra formas poliédricas con una inusual estructura policristalina.

Años más tarde, Wang y colaboradores, no sólo apoyaron la propuesta de Davis sino que agregaron que la celulosa componía un 90% de la pared celular fibrilar del alga y que los fucoidanos no solamente se encuentran en la matriz sino también dentro de la capa interna de la pared celular<sup>12</sup>.

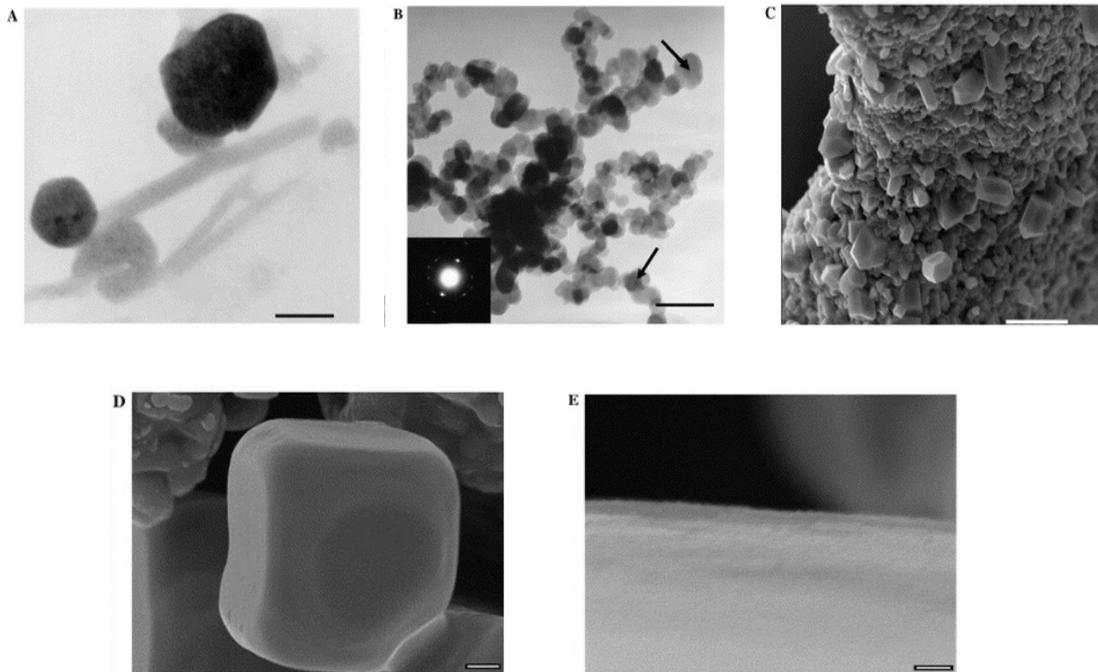


Figura 1.5. Microscopia electrónica y EDXA de un fucano sulfatado. A: TEM: el fucoidano muestra partículas con proyecciones poligonales. B: EDXA: las flechas muestran la naturaleza policristalina de la muestra. C: FESEM: el fucano sulfatado exhibe numerosas partículas con morfología poliédricas. D: FESEM: partícula de fucano sulfatado. E: Alta magnificación de una partícula del fucano mostrando una superficie ondulada. Figura modificada de Andrade y colaboradores<sup>5</sup>.

### 1.3. *Dictyota dichotoma*

La distribución de *Dictyota dichotoma* es universal aunque es más abundante en mares templados y cálidos (Figura 1.6). Se la puede encontrar sobre los sustratos rocosos o duros y en zonas inframareales desde la superficie hasta unos 20 m de profundidad.

Las denominaciones aceptadas para la especie, que hoy se conocen como sinónimos son: *Zonaria dichotoma* (Hudson), *Fucus dichotomus* (Hudson) Bertolini, *Haliseris dichotoma* (Hudson) Sprengel y *Dichophyllum dichotomum* (Hudson) Kützing<sup>13</sup>.

**Europa:** Costas de Bulgaria, Holanda, Turquía, Suecia, Noruega, España, Portugal, Francia, Italia, Gran Bretaña, Irlanda, Islas Baleares y en los Mares Negro y Adriático.

**Asia:** Costas de China, Corea, Filipinas, Hong Kong, Indonesia, Japón, Malasia, Rusia, Singapur, Tailandia y Vietnam.

**Oceanía:** Costas de Australia y Nueva Zelanda.



**América:** Costas de Estados Unidos, BÉlice, El Salvador, México, Panamá, Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Islas Galápagos, Perú, Venezuela y algunos países de las Antillas.

**África:** Costas de Argelia, Angola, Egipto, Eritrea, Gabón, Ghana, Kenia, Liberia, Libia, Madagascar, Mauritania, Mozambique, Senegal, Sierra Leona, Sudán, Tanzania, Togo, en el Mar Mediterráneo y algunas islas del Océano Índico.

**Figura 1.6. Distribución de la feofita *D. dichotoma* en los cinco continentes.**

A pesar de su temprana descripción en el año 1809<sup>14</sup> recién en el año 2011 se incorporó dicha feofita a la flora argentina, ubicándola en las provincias de Chubut y Santa Cruz (Figura 1.7)<sup>15</sup>.



**Figura 1.7.** Lugar de colecta de la feofita *Dictyota dichotoma* en las orillas de la bahía Bustamante, provincia de Chubut, Argentina, para el presente trabajo.

### **1.3.1. Datos taxonómicos**

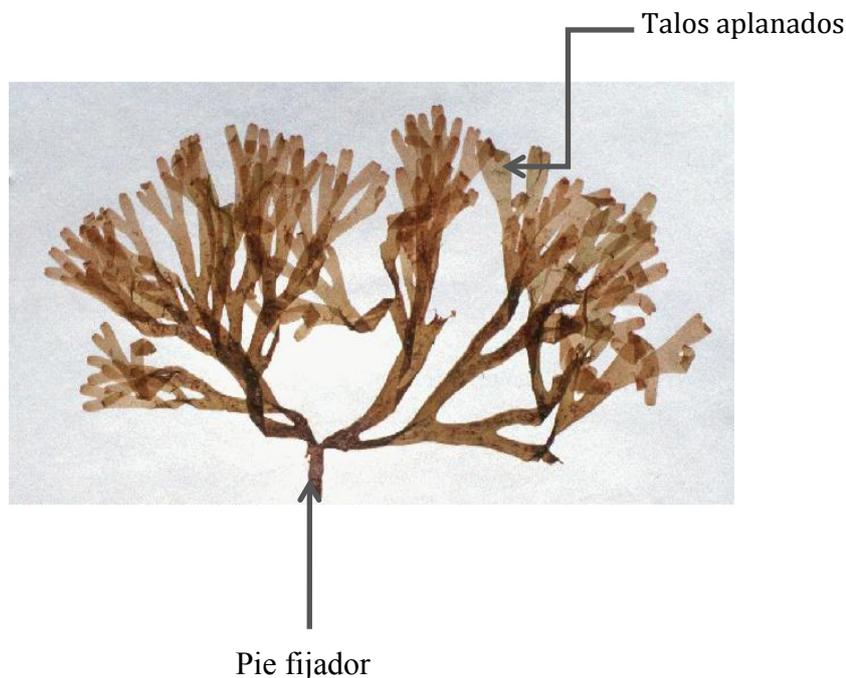
Las algas pardas son un grupo de algas pertenecientes a la clase *Phaeophyceae*, en el reino Chromalveolata, clasificadas en 265 géneros con más de 1500 especies principalmente marinas, y sólo seis géneros de agua dulce<sup>2</sup>. Las algas pardas se clasifican en 13 órdenes de acuerdo a la clasificación de Bold y Wynne<sup>1</sup>. Cabe señalar que los órdenes Laminariales y Fucales se distinguen por su abundancia y además sus algas son estructuralmente muy complejas. A continuación presento la ubicación taxonómica de la feofita *D. dichotoma*<sup>13</sup>:

**Ubicación taxonómica de la especie *Dictyota dichotoma*:**

Dominio.....Eucaryota  
Reino.....Chromalveolata  
División.....Heterokontophyta  
Clase.....Phaeophyceae  
Orden.....Dictyotales  
Familia.....Dictyotaceae  
Género.....*Dictyota*  
Especie.....*dichotoma*

**1.3.2. Datos morfológicos y reproductivos**

La especie *Dictyota dichotoma* presenta talos de entre 3 y 20 cm de longitud, planos, con ramificaciones típicamente dicotómicas con aspecto de cinta, erectos o postrados. Además, dichas feofitas se fijan al sustrato mediante un pie fijador discoidal alargado (Figura 1.8)<sup>16</sup>.



**Figura 1.8. Aspecto estirado de la feofita *D. dichotoma*. Disponible on line en: [http://www.aloj.us.es/carromzar/algas/Dictyota\\_dichotoma2.jpg](http://www.aloj.us.es/carromzar/algas/Dictyota_dichotoma2.jpg).**

El ciclo reproductivo de dicha feofita es digenético isomórfico diplohaplofásico, es decir, presenta un ciclo donde alternan dos generaciones morfológicamente iguales (digenético isomórfico) y dos fases nucleares, diploide y haploide (diplohaplofásico) (Figura 1.9)<sup>17-19</sup>. Posee una generación asexual que produce tetrasporas solitarias o en grupos pequeños y una generación sexual con gametofitos femeninos que producen oogonios en soros oscuros y gametofitos masculinos con anteridios pluriloculares en soros. El ciclo comienza con un talo independiente maduro diploide ( $2n$ ), donde se forman los soros, que por meiosis producirán cuatro tetrasporas desnudas no flageladas. De ahí el origen de las aplanosporas, de las cuales dos de ellas serán masculinas y dos femeninas. Estas germinarán y darán origen a un gametofito masculino y a un gametofito femenino, que son morfológicamente similares al esporofito<sup>19</sup>. En los talos de estos gametofitos se producen los soros, que en el caso del gametofito masculino dan origen a los anterozoides; mientras que en el caso del gametofito femenino, dan origen a los oogonios, que a su vez producen las ovocélulas. Estas son liberadas al medio donde al encontrarse ocurrirá la fecundación, seguida de la oogamia externa, la plasmogamia y la formación del cigoto ( $2n$ ). Este cigoto desarrolla una serie de divisiones mitóticas formando un esporofito maduro.

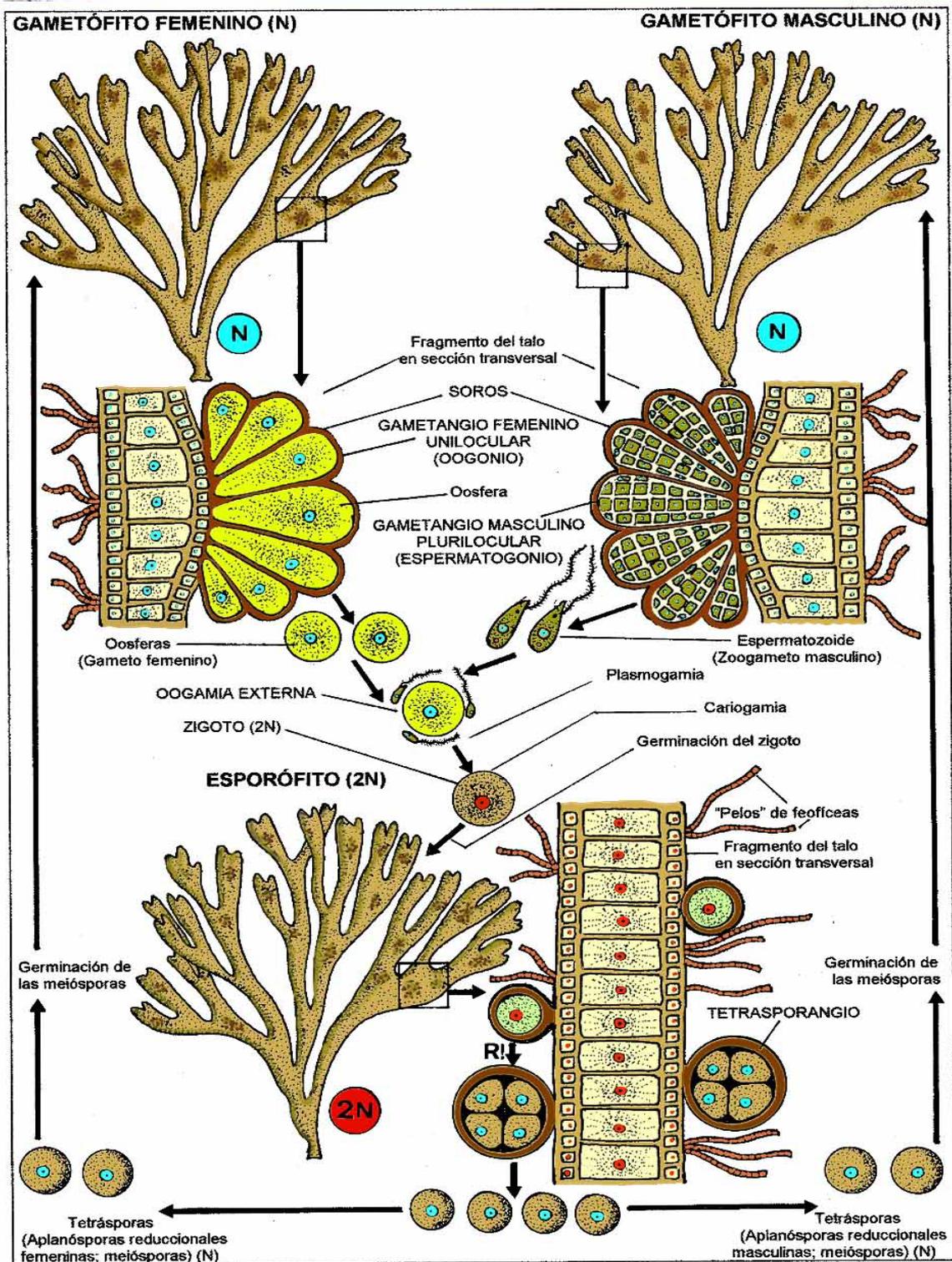


Figura 1.9. Figura del ciclo reproductivo de la feofita *D. dichotoma* adaptado de lo propuesto por Taylor<sup>19</sup>.

#### 1.4. Análisis de pureza, homogeneidad, dispersión y fraccionamiento de los polisacáridos

Los conceptos de pureza y homogeneidad pueden ser obvios para las moléculas de bajo peso molecular o de biopolímeros cuya síntesis está dirigida genéticamente en forma directa, como las proteínas. En todos estos casos las moléculas de un dado compuesto o proteína son idénticas entre sí. En los polisacáridos, polímeros sintéticos y en ciertas glicoproteínas, el concepto es diferente, ya que los polisacáridos están compuestos por moléculas que comparten un esquema común, pero con un rango de variaciones de distinto tipo<sup>20</sup>.

Se dice que un compuesto es puro si el valor de cada una de sus propiedades se mantiene constante para cualquier porción de muestra que se use para las determinaciones. En este caso, todas las moléculas de la muestra son iguales, y por lo tanto, no puede aplicarse ningún método de fraccionamiento. Un ejemplo demostrativo es que una muestra puede ser “pura” en términos de los monosacáridos constituyentes, pero si esta posee dos o más polisacáridos, la muestra será heterogénea<sup>20</sup>.

La manera de definir la homogeneidad es mediante la imposibilidad de su fraccionamiento por ningún método. La homogeneidad absoluta no puede ser demostrada, en cambio sí puede demostrarse la heterogeneidad de una muestra mediante un solo fraccionamiento que dé resultado positivo.

Otro concepto importante en los polisacáridos es el de dispersión. La dispersión se usa para comprender todas las formas de variación molecular que pueda presentar una muestra homogénea de un polisacárido<sup>20</sup>.

Se han definido todas las posibilidades de variaciones estructurales que puede presentar un sistema en función de su dispersión<sup>21</sup>:

- a) Una muestra es **monodispersa** si la variación de todos los parámetros medidos es cero.
- b) Una muestra es **paucidispersa** si está compuesta por una mezcla de componentes monodispersos.

- c) Una muestra es **polidispersa** si presenta una distribución unimodal, es decir, solo hay un máximo y dos puntos de inflexión.
- d) Una muestra es **heterodispersa** si presenta una distribución bimodal o polimodal para alguno de sus parámetros.

Si las muestras son monodispersas o polidispersas se las considera homogéneas, mientras que los sistemas paucidispersos o heterodispersos son heterogéneos.

El tipo de distribución puede ser distinto según la propiedad en estudio, es decir, una muestra puede ser polidispersa con respecto a un parámetro y polidispersa o heterodispersa con respecto a otros, por lo que resulta imprescindible hacer referencia a la propiedad cuya dispersión está en consideración.

Un sistema homogéneo polidisperso en teoría puede ser siempre fraccionado. Si es fraccionado no indica que sea heterogéneo, ya que si el sistema inicial es homogéneo, solo indica su dispersión.

En un sistema homogéneo polidisperso, el valor medible de un parámetro es un valor promedio, y por lo tanto, es importante tener en cuenta que los distintos métodos experimentales que miden una misma propiedad pueden dar valores distintos y ser todos correctos, ya que esos métodos experimentales proporcionan promedios diferentes. Los promedios más usados son los denominados promedios numérico ( $M_n$ ) y promedio pesado ( $M_w$ ). Por ejemplo, para una muestra con  $n_i$  componentes cuyos pesos moleculares son  $M_i$ , en concentraciones  $C_i$ , estos promedios se definen como:

$$M_n = \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i} = \frac{\sum_i c_i}{\sum_i \frac{c_i}{M_i}}$$

$$M_w = \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i} = \frac{\sum_i c_i M_i}{\sum_i c_i}$$

$$D = \frac{M_w}{M_n}$$

El promedio numérico se obtiene cuando la medición es proporcional al número de moléculas, sin tener en cuenta su tamaño, mientras que el promedio pesado se obtiene cuando la respuesta es proporcional al peso o al tamaño de las partículas<sup>20,21</sup>.

El índice de polidispersión (D), cociente entre  $M_w/M_n$ , da una idea de la dispersión del peso molecular. Si  $D \geq 1,6$ , se dice que el sistema es polidisperso; si  $D \leq 1,1$ , es monodisperso.

La finalidad del proceso de extracción, purificación y fraccionamiento de los polisacáridos es obtener una muestra homogénea. La obtención de los polisacáridos debe obtenerse considerando que la muestra debe dar un material tan homogéneo y con un rendimiento tan alto como sea posible. En muchos casos, estos dos objetivos son contrapuestos<sup>20</sup>.

En el aislamiento y purificación de los polisacáridos no se debe producir degradación de los mismos. A veces, la degradación de un polisacárido por ácidos o bases se aplica deliberadamente en el análisis estructural, pero el uso de estos métodos en la etapa de la extracción debe restringirse de modo de minimizar alteraciones incidentales en las moléculas.

Los fraccionamientos suelen estar basados en precipitaciones selectivas de los polisacáridos, de sus sales o complejos, o en procedimientos cromatográficos. Típicamente los polisacáridos se aíslan de soluciones acuosas por adición de solventes miscibles en agua, como acetona o alcoholes de bajo peso molecular. Si bien estos precipitados pueden secarse por tratamientos sucesivos con solventes orgánicos anhidros, se los obtiene en mejores condiciones físicas para su manipulación posterior cuando son liofilizados a partir de las soluciones acuosas<sup>21</sup>.

Los métodos de fraccionamiento que se usan a escala preparativa son la formación de un precipitado a partir del cual se puede regenerar el polisacárido original, o por cromatografía de intercambio iónico. La precipitación con detergentes catiónicos como

bromuro de cetiltrimetilamonio (cetavlon o cetrímide) y bromuro de cetilpiridinio también es de uso frecuente. En la cromatografía de intercambio iónico se suelen usar celulosa o geles entrecruzados (de dextrano, en Sephadex o de agarosa, en Sepharose) que poseen grupos funcionales adecuados como el 2-dietilaminoetil (DEAE)<sup>22</sup>.

Los procedimientos cromatográficos se usan a escala analítica como criterio de homogeneidad. Las diferencias de las separaciones se basan en:

- a) Tamaño molecular: filtración por geles o tamices moleculares.
- b) Composición: principalmente según la proporción de grupos ácidos mediante cromatografía de intercambio iónico.

El objetivo de resolver una muestra dada de polisacárido es establecer su pureza (ausencia de contaminantes) y mostrar la imposibilidad de posibles fraccionamientos que indiquen discontinuidad con respecto al tamaño molecular o estructura. La ausencia de heterogeneidad se demuestra por la constancia en la composición química y en sus propiedades físicas cuando el material es recuperado luego de un intento de separación o purificación.

## Referencias

1. Bold H.C. y Wynne M.J. "Introduction to the algae: Structure and reproduction". 2nd edn. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1985, pp. 516.
2. Davis T.A., Volesky B. y Mucci A. "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae". *Water Research*, 2003, **37**, 4311-4330.
3. Gupta S. y Abu-Ghannam N. "Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds". *Trends in Food Science & Technology*, 2011, **22**, 315-326.
4. Ponce N.M.A. "Estudio del sistema de polisacáridos de *Adenocystis utricularis*, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilización farmacológica e industrial", Tesis Doctoral, Depto. Farmacia, FCEyN., UNPSJB, 2006.
5. Andrade L.R., Salgado L.T., Farina M., Pereira M.S., Mourão P.A.S. y Amado G.M. "Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae". *Journal of Structural Biology*, 2004, **145**, 216-225.
6. Kloareg B., Demarty M. y Mabeau S. "Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae". *International Journal of Biological Macromolecules*, 1986, **8**, 380-386.
7. Haug A., Myklestad S., Larsen B. y Smidsrod O. "Studies on the Sequence of Uronic Acid Residues in Alginic Acid". *Acta Chemica Scandinavica*, 1967, **21**, 691-704.
8. Medcalf D.G. y Larsen B. "Fucose-containing polysaccharides in the brown algae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*". *Carbohydrate Research*, 1977, **59**, 531-537.
9. Medcalf D.G. y Larsen B. "Structural studies on ascophyllan and the fucose-containing complexes from the brown alga *Ascophyllum nodosum*". *Carbohydrate Research*, 1977, **59**, 539-546.
10. Medcalf D.G., Schneider T.L. y Barnett R.W. "Structural studies of a novel glucuronogalactofucan from *Ascophyllum nodosum*". *Carbohydrate Research*, 1978, **66**, 167-171.
11. Kloareg B. y Quatrano R.S. "Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix of polysaccharides". *Oceanography and Marine Biology- An Annual Review*, 1988, **26**, 259-315.

12. Wang J. y Chen C. "Biosorbents for heavy metals removal and their future". *Biotechnology Advances*, 2009, **27**, 195-226.
13. Anónimo <http://www.algaebase.org>.
14. Lamouroux J.V.F. "Exposition des caractères du genre Dictyota, et tableau des espèces qu'il renferme". *Journal de Botanique*, 1809, **2**, 38-44.
15. Boraso A. y Zaixso J.M. "Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino". *Algas marinas bentónicas*, 2011, pp. 1-28.
16. Smith G.M. "Cryptogamic botany" in "Algae and fungi", 2nd edn. Stanford University, Stanford, California, USA, 1955, pp. 546.
17. Van den Hoek, Mann D.G. y Jahns H.M. "Algae: an introduction to phycology". Cambridge University Press, Cambridge, 1995, pp. 627.
18. Williams J.L. "Reproduction in *Dictyota dichotoma*". *Annals of Botany*, 1898, **12**, 559-60.
19. Taylor W.R. "Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas". University of Michigan Press, Ann Arbor, 1960.
20. Cerezo A.S. "Polisacáridos. Pureza, homogeneidad y dispersión". *Manual de Métodos Ficológicos*, 1995, pp. 677-689.
21. Gibbons R.A. "Physico-chemical methods for the determination of the purity, molecular size and shape of glycoproteins" in "Glycoproteins. Their composition, structure and function", Gottschalk A. (ed.), Part A. Elsevier Publishing Co., New York, 1972, pp. 31-140.
22. Kolender A.A. "Polisacáridos de *Nothogenia fastigiata* y *Georgiella confluens* (Rhodophyta). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas", Tesis Doctoral, Depto. Química Orgánica, FCEyN, UBA, 2003.

## **Capítulo 2**

---

# **Polisacáridos de la pared celular de algas pardas**

---

## **2. Polisacáridos de la pared celular de algas pardas**

Las algas poseen polisacáridos de almacenamiento y estructurales. El polisacárido de almacenamiento es el laminarano, mientras que los polisacáridos estructurales son los alginatos y fucoïdanos y se encuentran en las paredes celulares, tejidos intercelulares y matriz mucilaginosa.

Este capítulo está dedicado a los antecedentes de estudios de la extracción, purificación y estructura de los fucoïdanos, alginatos y laminaranos de algas pardas.

### **2.1. Fucoïdanos**

#### **2.1.1. Nomenclatura**

En el año 1913, Kylin fue el primero en aislar un grupo de polisacáridos que contenían fucosa a los que denominó “fucoïdina”<sup>1</sup>; casi 50 años después, McNeely cambió el nombre fucoïdina por fucoïdano<sup>2</sup>, de acuerdo a la nomenclatura habitual de los polisacáridos. En los primeros extractos estudiados se encontraron diversas proporciones de otros monosacáridos, tales como galactosa, manosa, xilosa o ácidos urónicos y algunas veces incluso proteínas. Además, la composición del polisacárido variaba de acuerdo a la especie del alga<sup>3,4</sup>, proceso de extracción<sup>5,6</sup>, estación del año y condiciones climáticas locales<sup>7,8</sup>, lugar de colecta y edad del alga<sup>9</sup>. La incertidumbre radicaba en saber si estas diferencias se debían a la presencia de polisacáridos contaminantes<sup>4,10</sup> o si esos monosacáridos eran parte del polisacárido principal<sup>11,12</sup>, razón por la cual algunos autores consideraron reemplazar el término fucoïdano por fucano, para designar a todos los polisacáridos sulfatados conteniendo L-fucosa<sup>4</sup>.

Con el paso de los años, al mejorar los métodos de separación y las técnicas analíticas, se pudieron ir definiendo diferentes tipos de polisacáridos sulfatados a partir de distintas algas pardas. El primero fue el “ascofilano o xilofucoglicuronano”, para el que se describió que una parte podría tener una cadena principal de ácido manurónico y ramificaciones de 3-O-D-xilosil-L-fucosa 4-sulfato<sup>13,14</sup>, aunque la posibilidad de asociaciones supramoleculares no quedaba descartada. Otro grupo aislado fue el “sargasano o glicuronofucoglicano”, basado en una estructura lineal de D-galactosa

con ramificaciones de L-fucosa 3-sulfato u ocasionalmente un ácido urónico<sup>13,15</sup>. La nomenclatura no fue clara ya que se utilizó el nombre fucoídano para los homofucanos<sup>15</sup>. Sin embargo, muchos autores continuaron denominándolos fucoídina y en algunos casos crearon su propia nomenclatura como fucan sulfato<sup>16</sup> o el término fucoídano para describir a un polisacárido complejo conteniendo del 20% al 60% de L-fucosa<sup>17</sup>. La IUPAC, finalmente definió como fucano sulfatado al polisacárido basado principalmente en L-fucosa sulfatada conteniendo un porcentaje menor al 10% de otros monosacáridos. Este término fue aplicado fundamentalmente a los productos de invertebrados marinos<sup>18,19</sup>, mientras que el término fucoídano ha sido usado para los productos extraídos de las algas, donde suelen estar presentes otros monosacáridos.

En los últimos años, se racionalizó la presencia de tres tipos de polisacáridos diferentes dentro de los fucoídanos: a) los que contienen altas proporciones de fucosa, galactosa y grupos sulfato, a los que denominaron “galactofucanos”<sup>20,21</sup> o “fucogalactanos”<sup>22,23</sup>; b) los que contienen sólo fucosa y grupos sulfato, a los que llamaron “fucanos”<sup>24</sup>; y c) los que contienen diferentes monosacáridos, menor cantidad de grupos sulfato y proporciones importantes de ácidos urónicos, conocidos como “uronofucoídanos”<sup>17,25</sup>. Este último grupo incluyó a los “fucoglucuronanos”<sup>22</sup> y “fucomanoglucuronanos”<sup>26</sup>.

## **2.1.2. Composición**

### **2.1.2.1. Pretratamiento del alga**

Para la obtención de fucoídanos, el alga debe ser primero secada a temperatura ambiente y luego molida para obtener una mayor superficie del material<sup>27</sup>. La finalidad de realizar un pretratamiento es prevenir la coextracción de otros compuestos como el ácido algínico, laminaranos y proteínas.

En el año 1970, Whyte fue el primero en realizar un pretratamiento con una mezcla de solventes como metanol:cloroformo:agua (4:2:1), para separar lípidos, terpenos y fenoles<sup>28</sup>. Este método fue utilizado posteriormente por otros investigadores<sup>29,30</sup>.

Cabe señalar que los fucoídanos y alginatos poseen una alta afinidad por los fenoles y flavonoides, los cuales son adsorbidos durante la extracción de los polisacáridos<sup>27</sup>. Además, se han utilizado con éxito otros sistemas ternarios como

acetona:cloroformo:metanol (2:1:1)<sup>31</sup> y la extracción secuencial con solventes como éter de petróleo, etanol y formaldehído<sup>32</sup>, etanol, acetona y cloroformo<sup>9,33,34</sup>, y hexano- acetona<sup>35-37</sup> para evitar esos metabolitos secundarios.

La separación de pigmentos, proteínas y polifenoles, también se ha realizado por cromatografía hidrofóbica sobre la resina Polychrome-1<sup>34</sup>. Previamente se había utilizado con la misma finalidad, para los polisacáridos de *Fucus vesiculosus*, la resina XAD-2, en la cual los polisacáridos no fueron adsorbidos<sup>38</sup>. El solvente usado fue acetona<sup>21,39</sup> para separar pigmentos y lípidos. Otros solventes que han sido usados son el formaldehído acuoso<sup>40,41</sup>, metanol<sup>42</sup>, y el formaldehído:etanol (1:4)<sup>43</sup>. Algunos de estos solventes pueden ser usados sin alterar la estructura del fucoidano. Sin embargo, el formaldehído puede generar enlaces covalentes entre las proteínas y polifenoles o ácidos nucleicos, originando complejos de alto peso molecular. Estos pueden interactuar con los polisacáridos sulfatados dando como resultado una precipitación del complejo y una disminución del rendimiento del fucoidano. Además, la presencia de estas impurezas puede alterar la bioactividad del fucoidano<sup>27</sup>. El etanol ha sido muy utilizado<sup>3,9,25,29,44-46</sup> ya que posee la ventaja de extraer el manitol y los pigmentos. Cabe señalar que el manitol es el carbohidrato de bajo peso molecular más importante, variando su proporción de acuerdo a la estación, temperatura, profundidad, salinidad y estadio de desarrollo del alga.

### **2.1.2.2. Aislamiento y composición**

Una revisión bibliográfica realizada al comienzo de este trabajo sobre el estudio de los polisacáridos sulfatados conteniendo fucosa en algas pardas, reveló que tan solo 5 órdenes de los 13 existentes habían sido estudiados. Los órdenes más estudiados han sido Fucales y Laminariales, seguidos de Dictyotales y Ectocarpales, mientras que apenas ha sido estudiada alguna especie del orden Sphacelariales.

Como ya mencionamos, Kylin fue el primero en extraer con ácido acético diluído los polisacáridos sulfatados de las especies *Fucus vesiculosus* y *Ascophylum nodosum*, a los que llamó "fucoidina". Sin embargo, el fucoidano extraído además de contener fucosa, también contenía manitol, ácido algínico y laminaranos como contaminantes. El mismo

Kylin posteriormente informó que el fucoidano aislado de *Laminaria digitata* contenía L-fucosa y pentosas. Además, en el año 1915, Hoagland y Lieb<sup>47</sup> presentaron el primer ejemplo de cómo el proceso de extracción puede influir en la composición analizada de los fucoidanos. Las metodologías de extracción fueron modificadas a lo largo de los años posteriores.

En un intento por resolver el conflicto de la naturaleza del fucoidano, en el año 1950 Percival y Ross, extrajeron dicho polisacárido de las feofitas *F. vesiculosus*, *F. spiralis*, *Himanthalia lorea* y *Laminaria clustoni*. Su metodología involucró la extracción con agua (100 °C, 24 h), seguida de una extracción con  $\text{Pb}(\text{AcO})_2$  para remover el alginato y las proteínas, para luego agregar  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , con el fin de precipitar el alginato, resultando en un fucoidano aislado como un complejo con hidróxido de plomo. Para aislar el fucoidano libre de plomo, lo trataron con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluido y el fucoidano se obtuvo luego de filtrarlo y dializarlo. El más “puro” de los fucoidanos provino de *H. lorea*<sup>4</sup>, compuesto de cantidades importantes de fucosa y sulfato, así como de proporciones pequeñas de ácidos urónicos, galactosa y xilosa. En el año 1952, Black y colaboradores, informaron que las condiciones óptimas de extracción del fucoidano eran tres ciclos de HCl 0,1 M, a 70 °C, por 1 h. Además, sugirieron que para una extracción más eficiente con mayores proporciones de fucanos, debía incrementarse la proporción agua/alga, el tiempo de extracción y el número de extracciones<sup>6</sup>. La Tabla 2.1 recopila los primeros datos en la literatura acerca de la extracción de fucoidanos, basada en tratamientos con ácido acético o clorhídrico diluidos con la finalidad de mantener insolubles a los alginatos.

**Tabla 2.1. Informes de la extracción y composición de diferentes especies de algas pardas entre 1913 y 1950.**

<b>Año</b>	<b>Especie algal</b>	<b>Composición del fucoidano</b>	<b>Método de extracción</b>	<b>Ref.</b>
1913	<i>Laminaria</i> y <i>Fucus</i>	Fucosa	Ácido acético diluido	1
1915	<i>L. digitata</i>	Fucosa y pentosas	Ácido acético diluido	1
1915	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Poca fucosa sulfatada	Macerado en 2% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> por 24 h, filtrado y adición de HCl	47
1931	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Fucosa sulfatada	Extracciones con HCl 2% a temperatura ambiente por 48 h	48
1950	<i>F. vesiculosus</i> , <i>F. spiralis</i> , <i>Himanthalia lorea</i> y <i>L. clustoni</i>	Fucosa sulfatada con proporciones menores de ácidos urónicos, Gal y Xil	H <sub>2</sub> O (100 °C, 24 h) y Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	4
1952	<i>F. vesiculosus</i>	Fucosa sulfatada	HCl (0,1 M, 70 °C, 1h)x3	6

**Tabla 2.2. Métodos de extracción y composición química de fucoidanos de diferentes especies algales del orden Fucales.**

Espece algal	Método de extracción	Composición	Ref.
<i>Fucus distichus</i>	CaCl <sub>2</sub> al 2%, 85 °C, 5 h	Fuc (52%), SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (35%) <sup>a</sup>	49
<i>Fucus serratus</i>	CaCl <sub>2</sub> al 2%, 85 °C, 5 h	Fuc (33%), Xil (3%), Man (2%), Gal (3%) y Glc (24%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (18%) <sup>a</sup>	30
<i>Sargassum stenophyllum</i>	H <sub>2</sub> O (7% p/v, 12 h)	Fuc (68%), Xil (16%), Man (1%), Gal (14%) y Glc en trazas y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (18%) y AU (4%) <sup>b</sup>	17
<i>S. horneri</i>	H <sub>2</sub> O (100 °C, 1 h)	Fuc (100%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (17%) <sup>b</sup>	24
<i>S. patens</i>	H <sub>2</sub> O (100 °C)	Fuc (35%), Gal (18%) <sup>b</sup>	50
<i>S. polycystum</i>	H <sub>2</sub> O (100 °C, 2 h)	E1: Fuc (80%), Man (16%) y Glc (4%) E2: Fuc (95%), Man (1%) y Gal (4%) <sup>b</sup>	51
<i>S. tenerrimum</i>	HCl (0,1 M, 25-30 °C, 6 h)	Fuc (68%), Xil (17%), Man (tz), Gal (11%), Glc (4%) y AU (7%) <sup>b</sup>	52
<i>S. trichophyllum</i>	H <sub>2</sub> O (100 °C, 1 h)	Fuc (80%), Gal (20%), SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (26%) y AU (1%) <sup>b</sup>	53
<i>S. fusiforme</i>	HCl (0,1 M, 2 h)	Fuc (38%), Xil (1%), Man (2%), Gal (14%), Glc (43%) y GlcA (2%), SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (31%) y AU (1%) <sup>b</sup>	54
<i>Ascophyllum nodosum</i>	HCl (0,2 M, 4 h)	Fuc (25%), Xil (26%), GlcA (19%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (11%) <sup>a</sup>	14
<i>Ascophyllum nodosum</i>	CaCl <sub>2</sub> 1% a t. amb. y 70 °C y posterior mezcla	Fuc (95%), Xil (5%) <sup>b</sup>	55
<i>Ascophyllum nodosum</i>	H <sub>2</sub> O (t. amb., 7 h)	Fuc (52%), Xil (17%), Gal (6%), Glc (21%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (19%) <sup>b</sup>	56
<i>Turbinaria conoides</i>	HCl (0,1 M, 30-35 °C, 12 h)	Fuc (57%), Xil (15%), Man (tz), Gal (23%) y Glc (5%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (3%) <sup>b</sup>	57
<i>Hizikia fusiforme</i>	H <sub>2</sub> O (70 °C, 2 h)	Fuc (32%), Xil (6%), Man (23%), Gal (23%), Glc (8%), Rha (2%), Ara (5%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (12%) y AU (19%) <sup>b</sup>	58

<sup>a</sup> en % de polisacárido

<sup>b</sup> en % respecto a los azúcares componentes

Por ejemplo, las feofitas *F. distichus*<sup>49</sup> y *F. serratus*<sup>30</sup>, pertenecientes al orden Fucales mostradas en la Tabla 2.2, a pesar de haber sido extraídas en las mismas condiciones, presentan diferencias en su composición. Mientras, *F. distichus* presenta Fuc (52%), con alta proporción de grupos sulfato (35%), *F. serratus* tiene características de un heterofucoidano, es decir, presenta en mayor proporción a la Fuc (33%), seguido de Glc (24%), y proporciones menores de otros azúcares.

Cabe señalar que en la feofita *F. vesiculosus* no solamente se utilizaron métodos tradicionales<sup>6</sup> sino también la extracción asistida con microondas (EAM)<sup>59</sup>. En la EAM, las microondas inducen la vibración de las moléculas de agua y como consecuencia, la temperatura del líquido intracelular aumenta y el agua se evapora, ejerciendo una presión en la pared celular que se destruye, liberando el contenido intracelular al medio acuoso<sup>27</sup>. La EAM tiene alto rendimiento, con tiempos cortos de extracción siendo las condiciones óptimas: 8,16 atm, 1 min, usando una concentración de 4% de alga (p/v). En estas condiciones, el polisacárido extraído contenía 54% de fucosa, 11% de galactosa y 35% de xilosa<sup>59</sup>.

En el género *Sargassum* se destacan dos aspectos: a) las altas proporciones de fucosa, tal como se obtuvieron en la feofita *S. horneri* que presenta un homofucano<sup>24</sup> y b) las diferencias en la composición del fucoidano cuando las muestras son colectadas en dos lugares diferentes, tal como se observó en *S. polycystum*. En este estudio, los extractos E1 y E2 mostraron altas proporciones de Fuc (80% y 95%, respectivamente). Por otro lado, mientras E1 presentó proporciones moderadas de Man (16%), E2 presentó tan solo 1%. Además, E1 presentó Glc (3%) y E2 presentó Gal (4%)<sup>51</sup>.

El estudio de otra alga del orden Fucales como *Ascophyllum nodosum* demostró que un cambio de solvente produce un cambio importante en la composición del fucoidano obtenido ya que cuando este es extraído con CaCl<sub>2</sub> al 1% a temperatura ambiente y luego a 70 °C, y posteriormente ambos extractos se combinaron, se observa una proporción alta de Fuc (95%) acompañada de una proporción pequeña de Xil (5%)<sup>55</sup>. En cambio, el extraído con HCl (0,1 M, 2 h), además de presentar Fuc (25%) y Xil (26%), presentó GlcA (19%)<sup>14</sup>. Finalmente, el extraído con H<sub>2</sub>O a temperatura ambiente

durante 7 h, mostró Fuc, Xil, Gal y Glc en proporciones de 52%, 17%, 6% y 21%, respectivamente<sup>56</sup>.

En forma similar, la composición del fucoidano de *Undaria pinnatifida*, perteneciente al orden Laminariales (Tabla 2.3), también presentó variaciones dependientes de la concentración del solvente, el tiempo de extracción y la temperatura empleados.

Un estudio comparativo de varias especies, colectadas en diferentes lugares, en distintas etapas del desarrollo del alga y en diferentes estaciones del año, mostró tras extracción con HCl (0,4%, 20-25 °C) y con agua (60-70 °C), y posterior siembra en una columna hidrófoba de Polychrome-1 eluída con agua y etanol al 5% y 15%, que los fucoidanos de *L. cichorioides*, a los 0,8, 1,5 y 2 años de desarrollo en otoño y primavera presentaban altas cantidades de Fuc (72-87%), acompañada de menores cantidades de Glc, Gal, Man y Xil (<8%); mientras que los de *L. japonica*, colectada al 1<sup>er</sup> y 2<sup>do</sup> año mostraron proporciones menores de Fuc (50-86%), algo más de Gal (8-29%), mientras que el fucoidano del alga *F. evanescens* mostró Fuc (50-88%) y Xil (7-15%)<sup>9</sup>.

En el caso de *U. pinnatifida*, colectada en el norte y en el sur de la costa de Corea, se encontraron diferencias en su composición química a pesar de haber sido extraídas con el mismo procedimiento (HCl 0,1 N, a temperatura ambiente durante 24 h). Las feofitas colectadas en el norte y sur de Corea mostraron pequeñas diferencias en el contenido de Fuc (83-87%) y de Gal (13-17%)<sup>62</sup>. Sin embargo, la feofitas extraídas en el sur mostraron distintos resultados, ya que no solo hallaron un heterofucoidano compuesto de proporciones similares de Fuc (51%) y Gal (45%) sino que también encontraron que los monosacáridos estaban muy sustituidos por grupos sulfato y acetato (en 97% y 24%, respectivamente)<sup>63</sup>.

**Tabla 2.3. Métodos de extracción y composición química de fucoidanos de diferentes especies algales del orden Laminariales.**

Especie algal	Método de extracción	Composición	Ref.
<i>Laminaria angustata</i>	HCl a pH 2	Fuc (95%), Gal (2%), GlcA (3%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (41%) <sup>b</sup>	60
<i>L. japonica</i>	H <sub>2</sub> O (120 °C, 3 h)	Fuc (62%), Man (6%), Gal (24%), Glc (2%) y Ara (6%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (33%) y AU (2%) <sup>b</sup>	61
<i>L. saccharina</i> o <i>Saccharina latissima</i>	CaCl <sub>2</sub> (2%, 85 °C, 5 h)	Fuc (31%), Xil (1%), Man (2%), Gal (8%) y Glc (1%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (27%) y AU (9%) <sup>a</sup>	22
<i>Undaria pinnatifida</i>	HCl 0,15 N	Fuc (48%) y Gal (52%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (72%) <sup>b</sup>	46
<i>Undaria pinnatifida</i>	HCl (0,1 N, 24 h)	Sur: Fuc (83%) y Gal (17%) Norte: Fuc (87%) y Gal (13%) Cultivado: Fuc (63%), Gal (33%) y Glc (4%) <sup>b</sup>	62
<i>Undaria pinnatifida</i>	HCl (0,1 N, 24 h)	Fuc (51%), Xil (4%), Man (tz) y Gal (45%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (97) y AcO (24%) <sup>b</sup>	63
<i>Undaria pinnatifida</i>	HCl (0,1 N, 1,5 h, 60 °C)	Fuc (53%), Xil (2%), Man (5%), Gal (38%), Glc (2%) <sup>b</sup>	33
<i>Saccharina japónica</i>	HCl (0,1 N, 1,5h, 60 °C)	Fuc (47%), Man (6%), Gal (33%), Glc (14%) <sup>b</sup>	33
<i>Chorda filum</i>	HCl a pH 2	Fuc (91%), Xil (1%), Man (2%), Gal (3%) y Glc (4%) <sup>b</sup>	29

<sup>a</sup> en % de polisacárido

<sup>b</sup> en % respecto a los azúcares componentes

**Tabla 2.4. Métodos de extracción y composición química de fucoidanos de diferentes especies algales de los órdenes Dictyotales, Ectocarpales y Sphacelariales.**

Orden	Especie algal	Método de extracción	Composición	Ref.
Dictyotales	<i>Padina pavonia</i>	H <sub>2</sub> O a t. amb. y a 100 °C	Fuc (1%), Xil, Gal y Glc en tz, GlcA (90%) <sup>b</sup>	64
Dictyotales	<i>Padina tetrastomatica</i>	H <sub>2</sub> O (pH 6,5-7, 30-37 °C)	Fuc (54%), Xil (18%), Man (9%), Gal (9%), Glc (9%) y Rha (2%) y AU (14%) <sup>b</sup>	36
Dictyotales	<i>Dictyopteris plagiogramma</i>	Extracción secuencial con H <sub>2</sub> O a t. amb. (A), a 100 °C (B) y HCl a pH 2, 70°C, 4h (C)	Ext. A y B: Fuc (37%), Xil (6%), Man (7%), Gal (3%), Glc (37%) y GlcA (9%) Ext. C: Fuc (42%), Xil (10%), Man (8%), Gal (16%), Glc (3%) y GlcA (21%) <sup>b</sup>	65
Dictyotales	<i>Stoechospermum marginatum</i>	H <sub>2</sub> O (pH 6,5-7, 30-35 °C, 3,5 h)	Fuc (91%), Xil (3%), Man (1%), Gal (3%), Glc (2%) y GalA (4%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (10%) <sup>b</sup>	35
Ectocarpales	<i>Leathesia difformis</i>	Ext. secuencial con CaCl <sub>2</sub> al 2% y a 70 °C (Ec) y HCl a pH 2 (Ea)	Ec: Fuc (68%), Xil (11%), Man (8%), Gal (9%) y Glc (4%) Ea: Fuc (90%), Xil (6%), Man (4%), Gal (tz) y Glc (tz) <sup>b</sup>	66
Ectocarpales	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	HCl (pH 3, 100 °C, 15 min)	Fuc (62%), GlcA (10%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (29%) <sup>a</sup>	67
Ectocarpales	<i>Adenocystis utricularis</i>	H <sub>2</sub> O (EW1), CaCl <sub>2</sub> al 2% (EC1) y HCl a pH 2 (EA1), todos a t. amb., 7 h.	EW1: Fuc (74%), Xil (tz), Man (2%), Gal (22%), Glc (1%) y Rha (1%) EC1: Fuc (73%), Xil (1%), Man (4%), Gal (18%), Glc (2%) y Rha (2%) EA1: Fuc (84%), Xil (tz), Man (4%), Gal (10%), Glc (1%) y Rha (1%) <sup>b</sup>	25
Ectocarpales	<i>Chordaria flagelliformis</i>	CaCl <sub>2</sub> (2%, 85 °C, 5h)	Fuc (32%), Xil (1%), Man (1%), Gal (2%) y Glc (12%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (20%) y AU (13%) <sup>a</sup>	68
Ectocarpales	<i>Hydroclathrus clathratus</i>	H <sub>2</sub> O a t. amb. y a 100 °C	Fuc, Xil, Gal y Glc en tz., GalA (74%) <sup>b</sup>	64
Sphacelariales	<i>Sphacelaria indica</i>	HCl (0,1 M, 20-25 °C, 4 h)	Fuc (62%), Xil (12%), Man (3%), Gal (19%), Glc (4%) y SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (2%) y AU (3%) <sup>b</sup>	69

<sup>a</sup> en % de polisacárido

<sup>b</sup> en % respecto a los azúcares componentes

En el orden Dictyotales, se observó que no solo hay una mayor heterodispersión con respecto a los monosacáridos sino que también están presentes los ácidos urónicos GlcA y GalA.

En el orden Ectocarpales, se destacó la presencia de dos tipos de polisacáridos, uno con baja proporción de Fuc (<40%) como mostraron *Chordaria flagelliformis* e *Hydroclathrus clathratus* y otro con altas proporciones de Fuc (>60%), tal como mostraron *Leathesia difformis*, *Cladosiphon okamuris* y *Adenocystis utricularis*; mientras que en la especie estudiada del orden Sphacelariales, *Sphacelaria indica*, se destacó por la presencia de proporciones moderadas de Gal en la composición del fucoidano.

En conclusión, el aislamiento y composición de los polisacáridos conteniendo fucosa ha sido muy diverso, ya que muchas veces comprende un espectro complejo de monosacáridos dependiendo de la especie algal, método y tiempo de extracción, temperatura, solventes, lugar de colecta, estación del año y crecimiento del alga, demostrando que no es posible asignar una supuesta composición unívoca a los fucoidanos.

### **2.1.2.3. Antecedentes de *Dictyota dichotoma***

El alga *D. dichotoma*, seleccionada para investigar los polisacáridos sulfatados en la presente Tesis Doctoral, ha sido poco estudiada a nivel mundial. El primer reporte, proveniente de Egipto fue realizado en el año 1978<sup>70</sup>, en un estudio comparativo de la composición del fucoidano extraído con agua acidulada con HCl o TCA (pH 1) a 80 °C durante 3 h, analizándose en cada caso el sobrenadante (extracto soluble) y el residuo (fracción insoluble).

La Tabla 2.5 muestra que la fracción soluble del extracto con HCl presentó una proporción más alta de hidratos de carbono (52%), que el extracto soluble con TCA (4,3%). Por otro lado, la composición de azúcares mostró en ambos extractos proporciones moderadas de fucosa (<29%) y galactosa (<27%), y proporciones muy pequeñas de Xil, Man y Glc. Además, ambas fracciones mostraron la presencia de cantidades sustanciales de GlcA (31% y 21%), respectivamente. Por otro lado, se puede

apreciar que en la fracción insoluble en ambos casos no solo se observó menor cantidad de hidratos de carbono ( $\leq 16\%$ ) sino que sigue siendo un heterofucoidano con un descenso en la proporción del GlcA y enriquecido en Glc, alcanzando un 42% para el extracto insoluble en TCA.

**Tabla 2.5. Composición monosacáridica de los extractos de *D. dichotoma*<sup>70</sup>.**

	Hidratos de Carbono (%)	Azúcares componentes					
		Fuc	Xil	Man	Gal	Glc	GlcA
<b><u>Extracto HCl</u></b>							
Soluble (A)	52	22	9	13	17	8	31
Insoluble (B)	16	15	11	15	8	34	17
<b><u>Extracto TCA</u></b>							
Soluble (C)	4	28	9	11	26	5	21
Insoluble (D)	10	17	9	16	-	42	15

Otros ejemplares de esta misma especie fueron estudiados en la India encontrándose poca cantidad de hidratos de carbono (17%), proteínas (10%) y lípidos (1,5%)<sup>71</sup>.

Un año después la misma feofita, extraída en Tailandia fue estudiada por Kantachumpoo y Chirapart. Ellos extrajeron el polisacárido con H<sub>2</sub>O (100 °C, 2 h) y con HCl (pH 3, 75 °C, 5 h). En los extractos acuosos encontraron hidratos de carbono (43%) y grupos sulfato (7%); mientras que los extractos con HCl encontraron menor cantidad de hidratos de carbono (34%) y mayor cantidad de grupos sulfato (10%). La composición monosacáridica indica proporciones muy pequeñas de Fuc (<6%), y de Glc (<0,4%)<sup>51</sup>.

### 2.1.3. Purificación de los polisacáridos

Con la finalidad de obtener un polisacárido “puro”, tras la extracción se suele proceder al fraccionamiento de los extractos. Como se mencionó en el Capítulo 1, hay diversas formas de fraccionar y purificar los polisacáridos que incluyen precipitaciones

selectivas de los polisacáridos o de sus sales, el uso de procedimientos cromatográficos o el uso de la ultrafiltración.

Entre los métodos utilizados para la precipitación de los polisacáridos, se cuenta el uso de concentraciones crecientes de solventes como etanol<sup>34,64</sup> o acetona<sup>21,39,72</sup> o precipitación con metanol-cloroformo<sup>73</sup>, acetato de plomo e hidróxido de bario<sup>74</sup> y acetato de cobre y etanol<sup>74</sup>.

Otra forma de purificar los polisacáridos es utilizando detergentes catiónicos que en medio acuoso forman sales insolubles con los polisacáridos que poseen grupos sulfato y carboxilo. Los detergentes catiónicos utilizados en la precipitación son sales de amonio cuaternario como el cloruro de cetilpiridinio<sup>74,75</sup> y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio, también llamado bromuro de cetiltrimetilamonio, cetavlon o cetrimida<sup>17,22,25,37,76</sup>.

Otra opción para purificar a los polisacáridos es utilizar métodos cromatográficos. Las separaciones se pueden hacer con columnas de intercambio aniónico, permeación en geles y cromatografía hidrofóbica.

La cromatografía de intercambio aniónico se basa en la retención de los polisacáridos ácidos por grupos catiónicos que están unidos covalentemente a un soporte que suele ser macromolecular, como fibras de celulosa o geles entrecruzados (de dextrano, en *Sephadex*, o de agarosa, en *Sepharose*) modificados con grupos funcionales como el O-(2-dietilaminoetil), denominado DEAE como DEAE-Sephacel<sup>22,30,49</sup>, DEAE-celulosa<sup>33,35,60</sup>, DEAE-Sepharosa<sup>77</sup>, DEAE-Sepharosa CL-6B<sup>20,58</sup>, DEAE-Sepharosa FF<sup>23,35,36</sup> y DEAE-agarosa FF<sup>54</sup>.

La cromatografía de exclusión por tamaño o SEC (del inglés, *size exclusion chromatography*) se basa en la separación de los componentes de una muestra en función del peso molecular y la forma de cada uno de los componentes y del tamaño de poro de la matriz. Los geles más usados en el tema en estudio han sido los dextranos entrecruzados (*Sephadex*)<sup>42</sup>, y la agarosa entrecruzada (*Sepharose*)<sup>17,42,60</sup>.

Se ha utilizado también cromatografía hidrofóbica sobre Polychrome-1 (politetrafluoroetileno)<sup>9</sup> y un sistema de ultrafiltración (Milipore) con membranas de

diferentes tamaños de poros (100 KDa, 50 KDa, 10 KDa y 3 KDa), complementadas luego con cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-celulosa<sup>78</sup>.

### 2.1.4. Estructura

Luego de estudiar el alga *F. vesiculosus*, Conchie y Percival postularon un modelo de estructura de fucoidano basado en unidades de L-fucosa con enlaces glicosídicos principalmente  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2), sulfatadas en C-4 y conteniendo ramificaciones de fucosa sulfatadas cada cinco unidades, con la posibilidad de encontrar Fuc con uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), sustituida con unidades de fucosa sulfatada (Modelo I y II)<sup>4</sup>. Este modelo fue apoyado por estudios posteriores<sup>10,79</sup>, y prevaleció durante más de 40 años. Los modelos propuestos para los fucoidanos de *F. vesiculosus*<sup>80</sup> se presentan en la Figura 2.1.

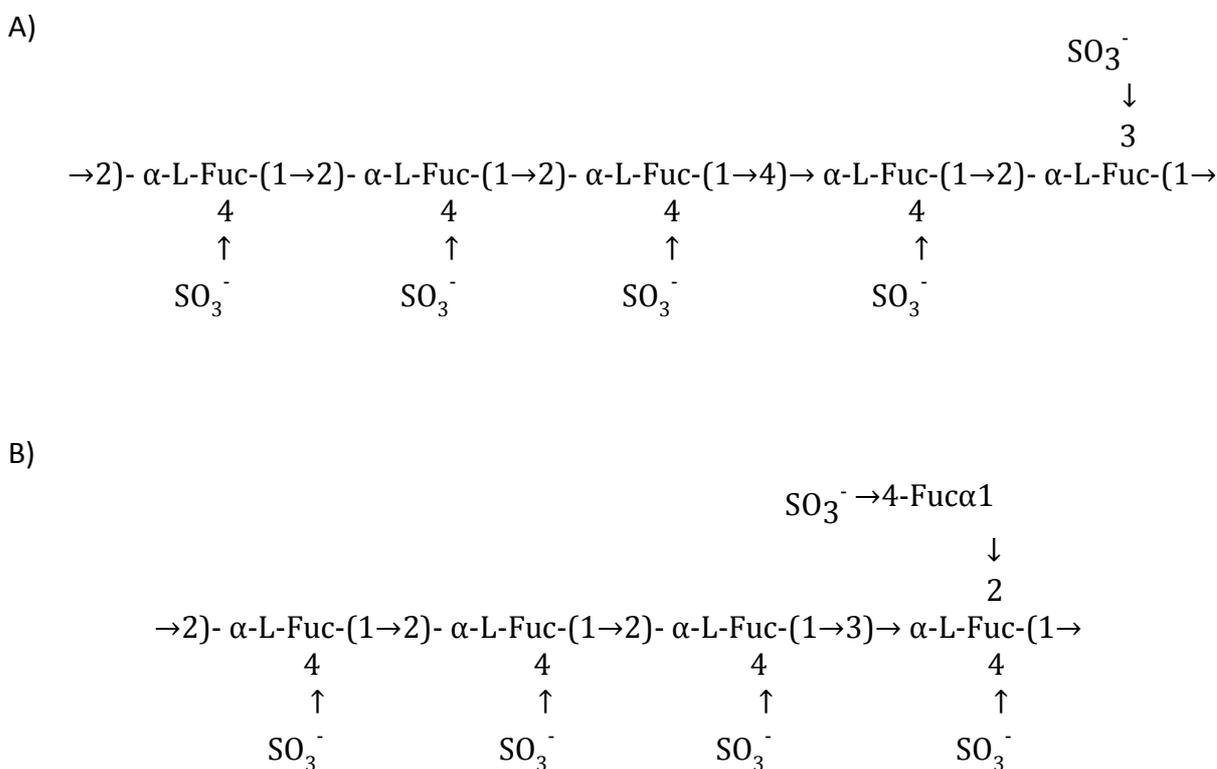
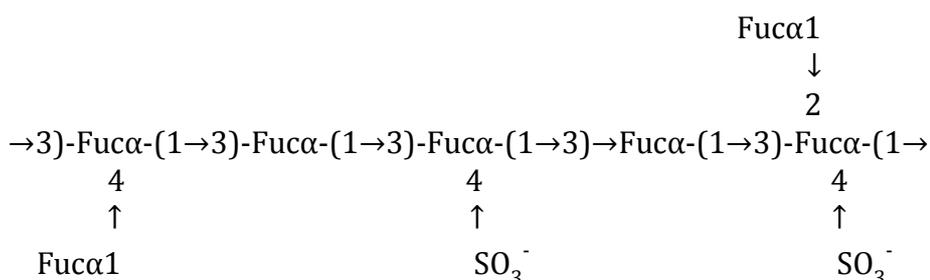


Figura 2.1. Estructuras del fucoidano de *F. vesiculosus* propuesto por Conchie y Percival en 1950<sup>80</sup>. A) Estructura lineal, y B) Estructura ramificada.

Más de 40 años después, Patankar y colaboradores propusieron otro modelo estructural para los polisacáridos de esta misma especie<sup>81</sup>. Este modelo difiere del anterior en que las uniones principales serían  $\alpha$ -(1→3) en vez de  $\alpha$ -(1→2). Además, el C-4, o bien estaría sustituido por un grupo sulfato, al igual que en el caso anterior, o por residuos de fucosa cada 2-3 unidades (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Estructura del fucoidano de la especie *F. vesiculosus* propuesto por Patankar y colaboradores<sup>81</sup>.

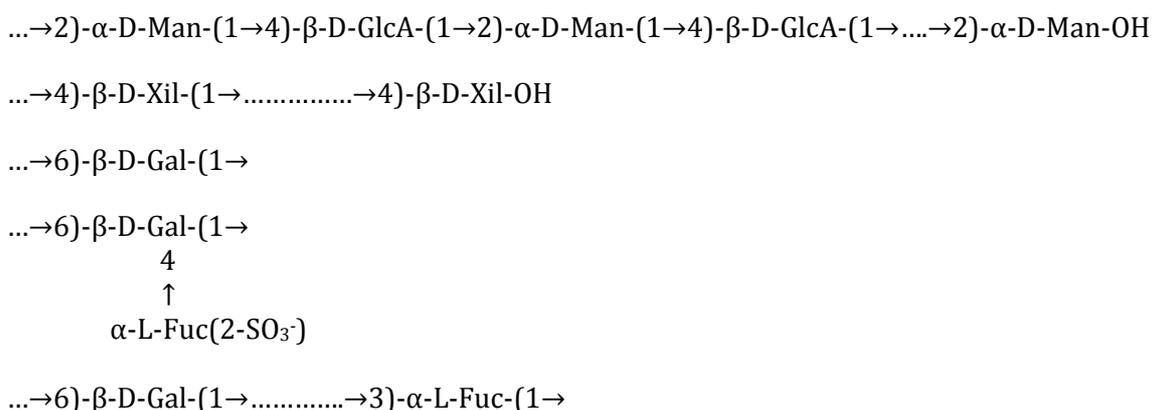
Para el fucoidano de *F. evanescens* se propuso un *core* lineal de  $\alpha$ -L-fucopiranososa con uniones alternadas en (1→3) y (1→4), sustituidas por grupos sulfato en O-2. La estructura propuesta es:  $\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→. Además, los grupos sulfato ocuparían la posición 4 en parte de los residuos de fucosa unidos en 3 y una parte de los grupos hidroxilos remanentes estarían aleatoriamente acetilados<sup>82</sup>; mientras, que *F. distichus*, presenta una estructura regular con sustituciones en C-2 y C-4 cuando los residuos de fucosa están enlazados en 3 y en C-2 cuando los residuos de fucosa están enlazados en 4. La estructura propuesta es:  $\rightarrow 3)$ - $\alpha$ -L-Fucp(2,4-di-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→4)- $\alpha$ -L-Fucp(2SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)-(1→<sup>49</sup>.

Para el polisacárido de *S. linifolium*, después de realizar una hidrólisis parcial, se determinó que poseía un polipéptido y un glucuronomanano. Este último estaba constituido por una cadena de 12 a 13 residuos de ácido D-glucurónico y 3 a 4 residuos de D-manosa enlazados en 4. Además, poseía cadenas laterales de D-galactosa, D-xilosa y L-fucosa<sup>83</sup>.

Los fucoidanos de *S. stenophyllum* presentan un sistema complejo. Se han agrupado en dos clases de fucoidanos, el primero se caracteriza por presentar fucosa, xilosa, galactosa, con un porcentaje alto de ácidos urónicos y bajo contenido de grupos sulfato. La cadena central de este polisacárido está formada por unidades de  $\rightarrow 6$ )- $\beta$ -D-galactosa y/o  $\rightarrow 2$ )- $\beta$ -D-manosa, con ramificaciones de cadenas con  $\alpha$ -L-fucosas unidas en 3 y/o en 4, ácido  $\alpha$ -D-glucurónico unido en 4,  $\beta$ -D-xilosa y, algunas veces  $\alpha$ -D-glucosa unidas en 4. En el segundo, los fucoidanos están compuestos por fucosa y galactosa, con un bajo contenido de ácidos urónicos y alta cantidad de grupos sulfato. La cadena central se reduce a cadenas cortas de galactanos<sup>17</sup>.

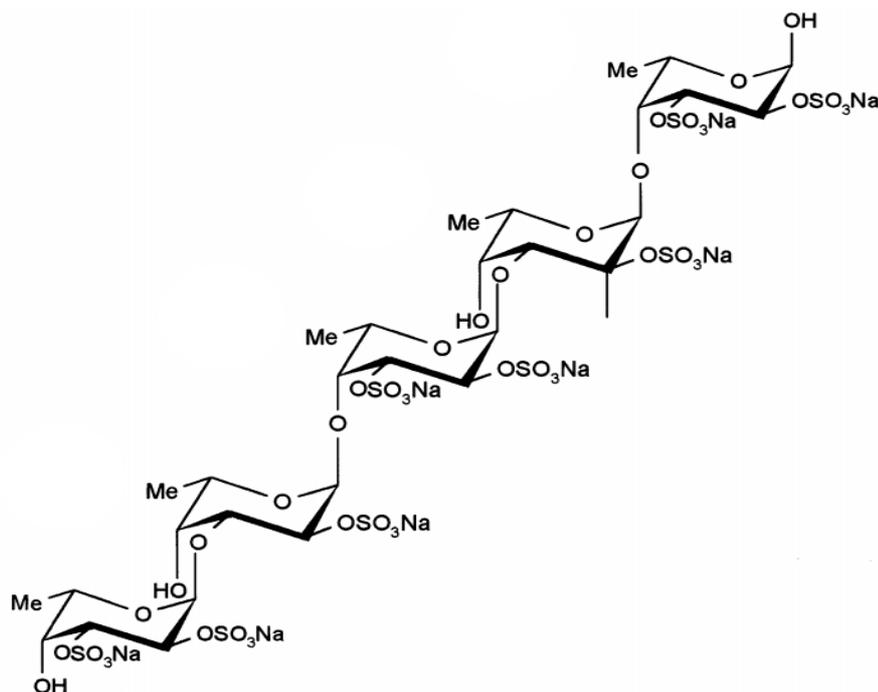
Una fracción (F4) de un galactofucoidano de *S. polycystum* estaba constituida básicamente por residuos de  $\alpha$ -L-fucopiranososa enlazados en 3, siendo sustituidas por grupos sulfato en 4. Cabe señalar que se han encontrado cadenas cortas con residuos de  $\alpha$ -D-galactopiranososa enlazados en 2 y sulfatados en 4<sup>84</sup>.

La fracción denominada HFS-2 de *S. fusiforme* mostró un fucoidano heterogéneo que consistía en un fucoglucuronomanano, fucoglucuronano, galactano y xilanos; mientras que la fracción HFS-3 estaba basada en un galactofucano sulfatado, donde los autores indican que no saben si se trata de cadenas de fucoidanos a las que se les unen residuos de galactosa o galactanos (Figura 2.3).



**Figura 2.3.** Fragmentos de los productos desulfatados HFS-3 de la feofita *S. fusiforme*<sup>54</sup>.

Chevolot y colaboradores hidrolizaron una fracción del fucoidano de *A. nodosum*, encontrando un oligosacárido de 8-14 residuos de fucosa con una estructura repetitiva regular disacarídica. Este fucoidano estaba altamente sustituido, con tres grupos sulfato por disacárido, principalmente sulfatados en posición 2, y en menor proporción en posición 3 (Figura 2.4).

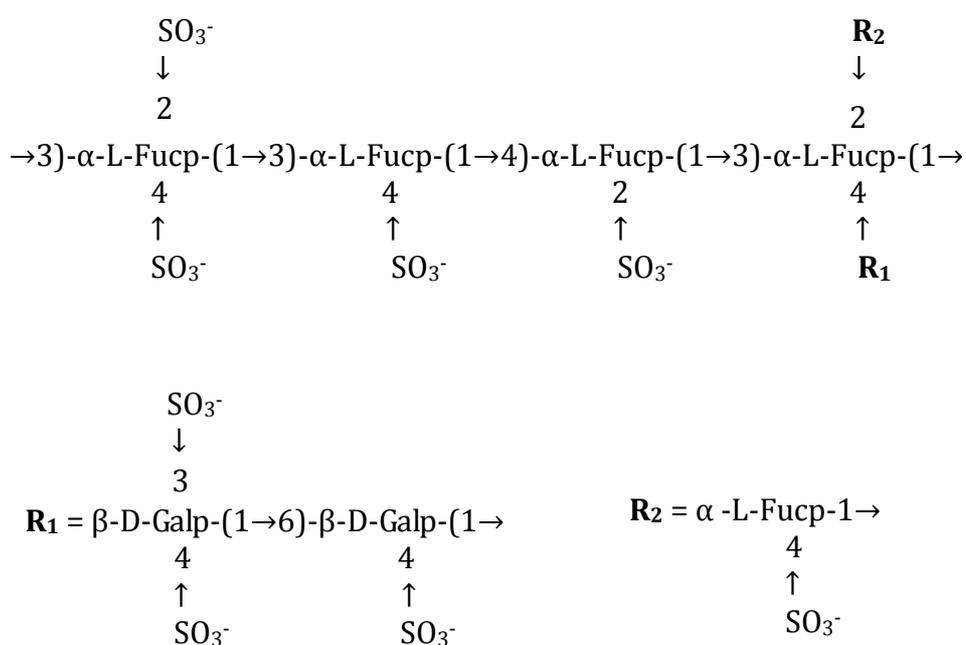


**Figura 2.4. Estructura propuesta por Chevolot y colaboradores para el fucoidano de *A. nodosum*<sup>77</sup>.**

Li y colaboradores hicieron una amplia investigación estructural de una fracción del alga marina *Hizikia fusiforme*<sup>58</sup> cuyo *core* estaba libre de fucosa. Para la fracción más importante (F32), por una combinación de reacciones y análisis, llegaron a la conclusión que el *core* de dicha fracción estaba compuesto principalmente de unidades de  $\rightarrow 2$ - $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$  y  $\rightarrow 4$ )- $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ ). Las ramificaciones aparecían en el C-3 de la manosa y el C-2 de la galactosa. Los residuos de xilosa principalmente se encuentran como extremos no reductores y proporciones menores estaban enlazadas en (1 $\rightarrow$ 4).



Nishino y colaboradores encontraron un galactano altamente sulfatado del *L. angustata*, cuya cadena central se basa en el disacárido  $\rightarrow 3$ )- $\beta$ -D-galactosa-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-galactosa-(1 $\rightarrow$ , y los grupos sulfato ocupan los C-6 de los residuos de galactosa enlazados en 3<sup>60</sup>; mientras que la estructura de una fracción (LF2) de *Laminaria japonica*<sup>23</sup> se basa en un galactofucano altamente sulfatado. La estructura consta de cadenas lineales de  $\alpha$ -L-Fucp con enlaces (1 $\rightarrow$ 3), en mayor proporción (75%) y con enlaces (1 $\rightarrow$ 4), en proporciones menores (25%). Se producen ramificaciones en C-2, por residuos de galactopiranososa y en C-4, por residuos de fucosa terminal en algunos residuos de fucosa enlazados en 3, tal como muestra la Figura 2.6.



**Figura 2.6. Estructuras propuestas para los fucoidanos de la especie *Laminaria japonica*<sup>23</sup>.**

En ese mismo año, Bilan y colaboradores, hicieron un estudio estructural detallado del fucoidano de *Saccharina latissima*, previamente llamada *Laminaria saccharina*. Encontraron tres tipos de polisacáridos sulfatados: a) un fucogalactano, que tiene una cadena central de residuos de galactopiranosas enlazados en 6, conteniendo galactosa terminal y en proporciones menores al disacárido  $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp-(1 $\rightarrow$ ; b) un fucoglucuronomanano, basado en unidades alternadas de ácido  $\beta$ -D-glucurónico enlazadas en 4 y residuos de  $\alpha$ -D-manopiranososa enlazados en 2, con ramificaciones de residuos de  $\alpha$ -L-Fucp enlazados al C-3 de  $\alpha$ -D-Manp; y c) un fucoglucuronano, cuyos



En el 2011, Vishchuk y colaboradores, estudiaron la estructura de una fracción (Up-F2) de *Undaria pinnatifida*, encontrando un galactofucano parcialmente acetilado con un alto grado de sulfatación cuyo *core* se basa en residuos de fucosa enlazados en 3 y/o 4, sulfatados en posición 2 y en menor proporción se encuentran residuos de galactosa y/o fucosa en C-4<sup>33</sup>.

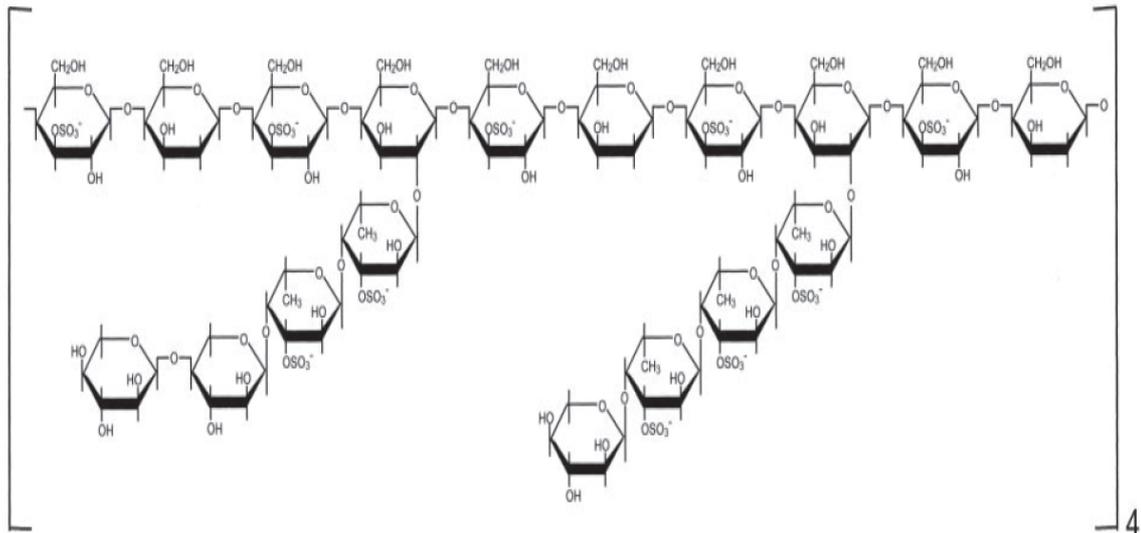
La estructura del polisacárido de *Chorda filum* fue estudiada por Chizhov y colaboradores. Este homofucano sulfatado tiene un *core* de residuos de fucopiranosas enlazados (1→3), con ramificaciones cada 6 residuos de azúcar principalmente en C-2. Algunos residuos de fucosa están sulfatados en O-4 y en C-2 pueden aparecer sustituidos por grupos sulfato o acetato<sup>29</sup>.

En el año 1979, Hussein y colaboradores estudiaron la estructura de *D. dichotoma* proponiendo un polisacárido altamente ramificado conteniendo los residuos de GlcA y Glc con enlaces (1→4), Fuc con enlaces (1→2), y además encontraron proporciones menores de Xil y Man con enlaces (1→4)<sup>85</sup>. Por otro lado, el mismo grupo caracterizó la estructura del polisacárido de *Padina pavonia* y la describió como compuesta por un *core* de residuos de GlcA, Man y Glc enlazados (1→4), y aunque no indican el átomo de carbono en el cual se enlazan las ramificaciones, las cuales presentan residuos de Gal y Glc unidos en 4, Gal 3-sulfato,  $\alpha$ -L-Fuc 4-sulfato, y residuos de xilosa enlazados en 3<sup>85</sup>.

Percival y colaboradores estudiaron la estructura del polisacárido de *Dictyopteris plagiogramma*, encontrando que contiene residuos de GlcA enlazados en 4. Además, la xilosa, fucosa y el ácido glucurónico se encuentran unidos en el polisacárido. La Fuc presenta enlaces (1→3), la Xil muestra enlaces (1→2), y la manosa está enlazada en 6. Además, los residuos de Gal y Man se encontraron principalmente disustituidos; en las galactosas la sustitución fue en O-3/O-4 (principalmente) y O-3/O-6; mientras que en las manosas fue en O-3 y O-6<sup>65</sup>.

El xilofucoglucuronano de *Spatoglossum schröderi*<sup>72</sup> se basa en un *core* de cadenas de ácido glucurónico con enlaces  $\beta$ -(1→3), ramificado en C-4 por residuos de Fuc con enlaces  $\alpha$ -(1→3). La fucosa está sustituida en el C-4 por grupos sulfato y C-2 por cadenas de xilosa parcialmente sulfatada con enlaces  $\beta$ -(1→4). En el año 2005, Rocha y colaboradores reportaron que la cadena central estaba compuesta por residuos de Gal

enlazados en 4, parcialmente sulfatados en O-3. Este polisacárido también presenta ramificaciones de un oligosacárido (mayormente tetrasacárido) compuesto por residuos de  $\rightarrow 4$ -Fuc 3-sulfato-(1 $\rightarrow$ ) y de uno o dos residuos de xilosa enlazados en 4, tal como muestra la Figura 2.8<sup>39</sup>.



**Figura 2.8.** Estructura propuesta para el galactofucano sulfatado del alga *Spatoglossum schröderi*<sup>39</sup>.

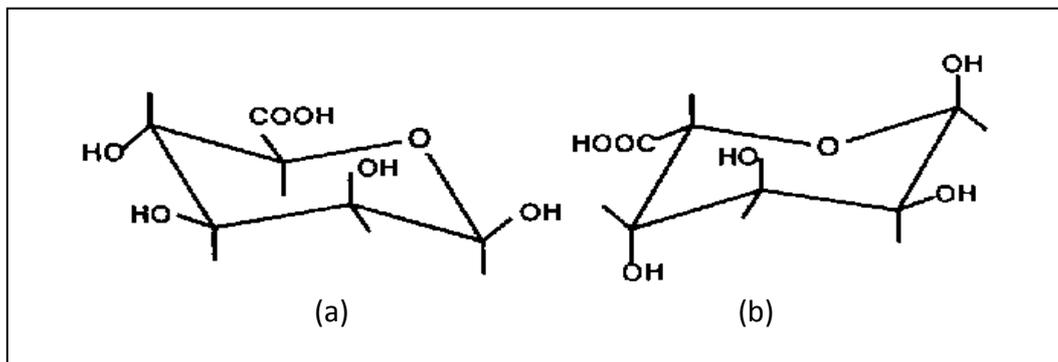
Una fracción de fucoidanos de *Chordaria flagelliformis* presenta un core de residuos de fucosa enlazados en 3, donde la tercera parte de los residuos se encuentran glicosilados en C-2 por residuos de ácido  $\alpha$ -D-glucopiranosilurónico. Cerca de la mitad de estos últimos residuos a su vez están glicosilados en C-4 por residuos de fucofuranosa o por disacáridos  $\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Fucf-(1 $\rightarrow$ ). Los residuos de fucofuranosa están mono y disulfatados en diferentes posiciones, mientras que otros grupos sulfato ocupan la posición en el C-2 y C-4 del core, y la última posición está parcialmente acetilada<sup>68</sup> (Figura 2.9).



## 2.2. Ácido algínico y alginato

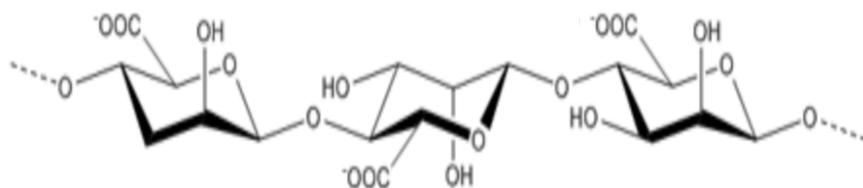
### 2.2.1. Estructura

Como se mencionó en el Capítulo 1, los alginatos, o sales del ácido algínico, son unos de los polisacáridos más importantes de la pared celular de las algas pardas. El ácido algínico es un polisacárido lineal constituido por dos unidades monoméricas, el ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) y el ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). Estos se agrupan en bloques de secuencias MM y MG, unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) y bloques GG y GM, enlazados por uniones  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4). La Figura 2.10, muestra los dos monómeros que constituyen el ácido algínico. Desde otro punto de vista, se puede describir a los alginatos como bloques de secuencias homopoliméricas (MM y GG) y bloques heteropoliméricos (GM y MG)<sup>87</sup>.

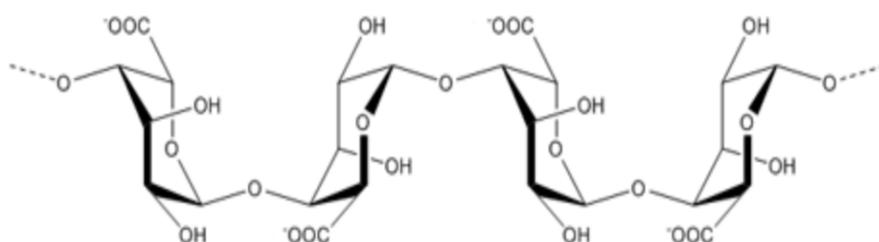


**Figura 2.10. Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico. (a) Ácido  $\beta$ -D-manurónico y (b) Ácido  $\alpha$ -L-gulurónico<sup>87</sup>.**

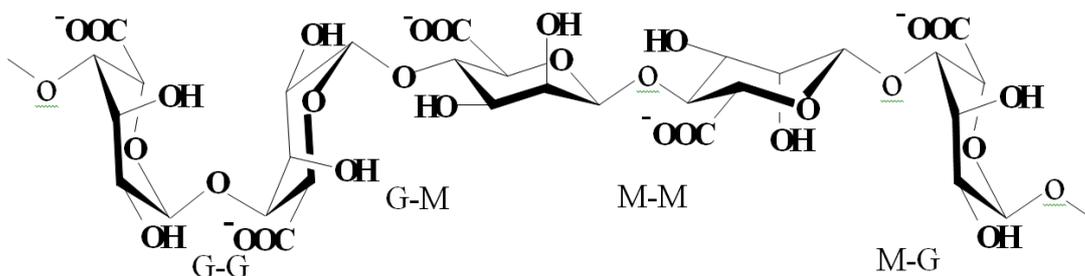
Los bloques MM son cadenas lineales solubles, presentando una estructura en forma de cinta y su repetición molecular es de 10,35 Å<sup>88</sup>; mientras, que los bloques GG son insolubles, su estructura es en forma de bucle y su repetición molecular de menor distancia (8,7 Å)<sup>89</sup>. Esta diferencia de conformaciones entre estos dos bloques de homopolímeros es la principal responsable de la afinidad a iones de metales pesados<sup>90</sup> (Figura 2.11).



(a)



(b)



(c)

**Figura 2.11. Estructura del ácido alginico. (a) Bloques MM, (b) Bloques GG y (c) Bloques MG o GM<sup>90</sup>.**

Las características de los alginatos dependen de la composición de los ácidos urónicos, es decir, de la relación M/G, lo cual se ve reflejado en las características del gel que es formado en presencia de cationes divalentes<sup>91</sup>. El alginato con baja relación M/G forma geles fuertes, mientras que los que presentan alta relación M/G forman geles elásticos<sup>92</sup>.

La proporción de M/G en el alginato puede determinarse mediante la aplicación de una hidrólisis ácida seguida del análisis de los ácidos urónicos resultantes del gradiente de elución de una cromatografía de intercambio aniónico<sup>93</sup>. También se ha informado el uso de cromatografía gas-líquido<sup>94</sup>, dicroísmo circular<sup>95</sup> y análisis por RMN<sup>96</sup>.

**Tabla 2.6. Porcentajes y relación M/G para varias especies algales.**

Especie	% M	%G	M:G
<i>Laminaria hyperborea</i>	31	69	0.45
<i>Laminaria digitata</i>	59	41	1.45
<i>Macrocystis pyrifera</i>	61	39	1.56
<i>Ascophyllum nodosum</i>	65	35	1.85
<i>Lessonia nigrescens</i>	60	40	1.50
<i>Ecklonia cava</i> y <i>Eisenia bicyclis</i>	62	38	1.60

El ácido algínico se encuentra como una mezcla de sales insolubles de todos los cationes que aparecen en el agua de mar, principalmente  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ . Si bien el ácido algínico es usualmente considerado como un componente específico de las feofitas, también son producidas por bacterias tales como *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter crocomum*, algunas especies de *Pseudomonas*<sup>97</sup> y en proporciones pequeñas, en algunas algas rojas de la familia Corallinaceae<sup>98</sup>.

### 2.2.2. Formación del alginato de calcio

Una de las características más importantes del alginato es su capacidad de formar geles insolubles de alginato de calcio. Para explicar las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas fue propuesto el modelo denominado caja de huevos<sup>99</sup>.

Según este modelo, dos cadenas de bloques GG se alinean formando un sitio de coordinación, cuya concavidad posee el tamaño adecuado para acomodar al ion  $\text{Ca}^{2+}$  u otro metal divalente de similar tamaño. Además, dichas moléculas tienen en su estructura grupos carboxilos y átomos de oxígeno electronegativos, los cuales son ligandos favorables que permiten un alto grado de coordinación con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . A los bloques de ácido poligulurónico se les une un extremo terminal de bloques de cadenas homopoliméricas del ácido polimanurónico dando como resultado la formación de un gel<sup>99</sup> (Figura 2.12).

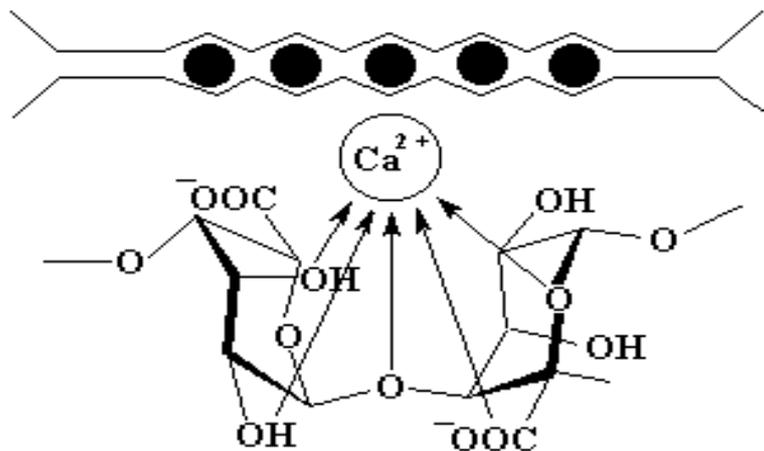


Figura 2.12. Diagrama del modelo de caja de huevos<sup>99</sup>.

### 2.2.3. Aplicaciones

La propiedad más importante del alginato es la habilidad para formar soluciones viscosas en agua. El gel de alginato de calcio es usado en la adsorción de los iones de metales pesados divalentes como  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , etc., incrementando su poder de adsorción conforme incrementa la proporción de ácido gulurónico en el alginato y la cantidad de bloques de ácido poligulurónico, siendo ambos parámetros importantes en el alginato para la adsorción de metales pesados<sup>100</sup>.

Aunque el alginato carece de valor nutricional, es usado como aditivo de los alimentos para cambiar, espesar y estabilizar su textura<sup>97</sup>. También es ampliamente utilizado en las industrias textil, papelera, farmacéutica, y cosmética<sup>101</sup>.

En medicina, el alginato es empleado como una matriz en forma de micropartículas para encapsular y/o liberar células, drogas o antígenos<sup>102</sup>. Su inespecificidad y falta de toxicidad han contribuido a que la *US Food & Drug Administration* lo aprobara para su uso en humanos<sup>103</sup>.

Experimentos farmacológicos en ratas han demostrado que el alginato disminuye los triglicéridos, el colesterol total y está asociado a lipoproteínas de baja densidad<sup>104</sup>, además de poseer una significativa actividad antiviral<sup>105</sup> por lo que sus eventuales aplicaciones en el área biomédica son más que promisorias.

## **2.3. Laminaranos**

### **2.3.1. Estructura**

Los laminaranos y el manitol constituyen productos de reserva en una gran variedad de feofitas y crisófitas en cantidades importantes, mientras que en las clorófitas se los ha encontrado en algunas especies en proporciones pequeñas<sup>106</sup>. En las rodófitas no se los ha descrito.

Los laminaranos pueden encontrarse en dos formas que se distinguen por su solubilidad en agua fría, y por lo tanto son llamados laminaranos “solubles” e “insolubles”, aunque ambos son solubles en agua caliente<sup>106</sup>. La solubilidad es influenciada por el grado de ramificación. El laminarano altamente ramificado es soluble en agua fría, mientras que el laminarano con bajo nivel de ramificación es soluble en agua caliente<sup>107</sup> y pueden obtenerse usando una solución de ácido clorhídrico diluida en frío o a 70 °C, respectivamente.

Los laminaranos constan de dos tipos de cadenas (cadenas M o G), la cadena G consta de aproximadamente 20-25 residuos de glucosa con enlaces  $\beta$ -(1→3) y con ramificaciones  $\beta$ -(1→6), con un peso molecular aproximadamente de 5000 Da. En cambio, la cadena M presenta residuos terminales de manitol (Figura 2.13).

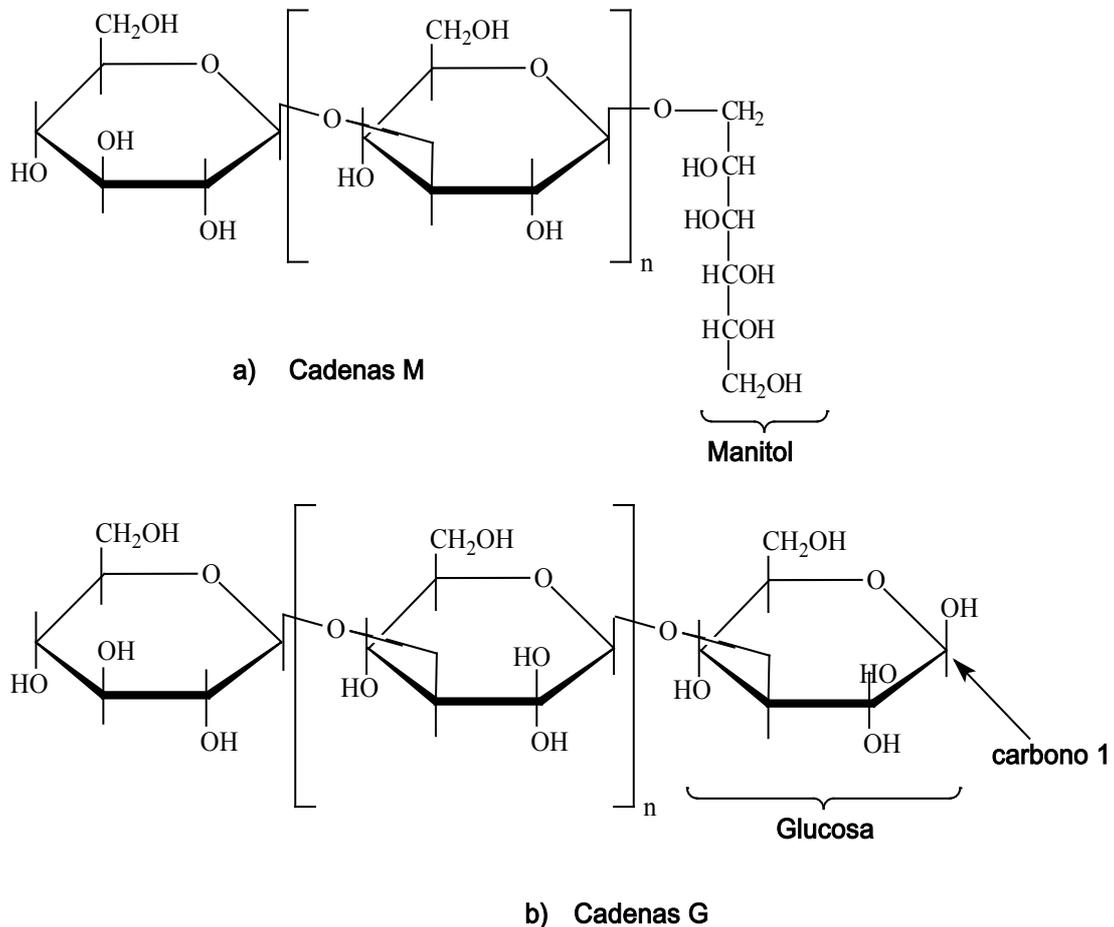


Figura 2.13. Estructura del laminarano. a) El manitol se une al extremo reductor (cadenas M); b) Cadenas de glucosa (cadenas G)<sup>100</sup>.

### 2.3.2. Antecedentes

El laminarano de *S. fusiforme* fue estudiado por Jin y colaboradores. Ellos encontraron un laminarano soluble, cuyo *core* estaba basado en residuos de glucosa enlazados en C-3 (66%), con proporciones pequeñas de glucosa enlazadas en 6 (4%), además también encontraron glucosa en forma de terminales no reductores (15%) y los análisis de RMN confirmaron la ausencia del manitol<sup>54</sup>.

En un estudio de los laminaranos de la feofita *Ascoseira mirabilis*, se encontraron diferentes proporciones de los residuos de glucosa enlazados en C-3 y C-6, con un grado de polimerización promedio de 25. Además, en la cadena, el residuo reductor de glucosa está unido glicosidicamente a uno de los grupos hidroxilo primarios del D-manitol. Los extractos con cloruro de calcio, ácido y el extracto alcalino fueron

analizados por cromatografía de intercambio iónico, obteniendo un rendimiento total muy bajo (0,9%). Los análisis de metilación del extracto con cloruro de calcio a 70 °C, mostraron que este glucano solo tenía enlaces  $\beta$ -(1→3), con una proporción pequeña de ramificación (4%); en el análisis de RMN se observaron los enlaces  $\beta$ -(1→3) y  $\beta$ -(1→6). Los análisis de RMN del laminarano extraído con cloruro de calcio a temperatura ambiente, mostraron que dicho glucano tenía el 75% de unidades enlazadas (1→3) y el 25% enlazadas (1→6), mientras que el laminarano de los extractos alcalinos tenían proporciones de 40% y 48%, respectivamente<sup>108</sup>.

Los laminaranos de *P. pavonia*<sup>3</sup> tienen idéntica estructura que los de las feofitas *H. lorea* y *B. bifurcata*, es decir, dicho glucano se basa en residuos de glucosa enlazados  $\beta$ -(1→3), acompañado de proporciones menores de residuos de glucosa enlazados  $\beta$ -(1→6); mientras que el del alga *Dictyopteris plagiogramma*<sup>65</sup> solo presentaba cadenas M con un peso molecular de 3000 Da.

Los laminaranos de *Desmarestia aculeata*<sup>44</sup> colectadas en agosto y en marzo tuvieron un rendimiento de 5,6% y 1,8%, respectivamente. Ambos laminaranos se basan en residuos de glucosa enlazados  $\beta$ -(1→3), acompañados de una proporción pequeña de manitol (1,7%). Cabe señalar que en dicho extracto es la primera vez que se encontró una cantidad considerable de fructosa. A pesar de los intentos por mostrar que la fructosa estaría actuando como un grupo terminal como el manitol, éstos fueron infructuosos. En dicha especie también se encontraron gentiobiosa, laminaribiosa, -triosa y -tetraosa, junto con isomaltosa.

Los laminaranos de las especies *Desmarestia firma*<sup>109</sup> y *Desmarestia ligulata*<sup>108</sup> tuvieron un rendimiento mucho menor que los de *Desmarestia aculeata*<sup>44</sup>, los cuales fueron de 1,8% y 0,08%, respectivamente. En *Desmarestia firma*, solo se encontraron cadenas G, mientras que en *Desmarestia ligulata* además de poseer cadenas G, también se encontraron cadenas M, cuya relación de glucosa:manitol fue de 25:1.

## Referencias

1. Kylin H. "Zur biochemie der Meersalgen". *Zeitschrift fur Physiologische Chemie*, 1913, **83**, 171-197.
2. McNelly W.H. "Fucoïdan" in "Industrial gums", Whistler R.L. (ed.), Academic Press, New York, USA, 1959, pp. 117-125.
3. Mian J. y Percival E. "Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*. Part I. Extraction and fractionation". *Carbohydrate Research*, 1973, **26**, 133-146.
4. Percival E.G.V. y Ross A.G. "Fucoïdin. Part I. The isolation and purification of fucoïdin from brown seaweeds". *Journal of the Chemical Society*, 1950, 717-720.
5. Mabeau S., Kloareg B. y Joseleau J.P. "Fractionation and analysis of fucans from brown algae". *Phytochemistry*, 1990, **29**, 2441-2445.
6. Black W.A.P., Dewar E.T. y Woodward F.N. "Manufacturing of algal chemicals 4: laboratory scale isolation of fucoïdan from brown marine algae". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1952, **3**, 122-129
7. Black W.A.P. "The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British laminariaceae and fucaceae". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1954, **5**, 445-448.
8. Von Holdt M.M., Ligthelm S.P. y Nunn J.R. "South African seaweeds: Seasonal variations in the chemical composition of some phaephyceae". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1955, **6**, 193-197.
9. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Chizhob A.O., Krupnova T.N., Sundukova E.V. e Isakov V.V. "Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions". *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, **294**, 1-13.
10. O'Neill A.N. "Degradatives studies on fucoïdin". *Journal of the American Chemical Society*, 1954, **76**, 5074-5076.
11. Schweiger R.G. "Methanolysis of fucoïdan. I. Preparation of methyl  $\alpha$ -L-fucoside and L-fucose". *Journal of Organic Chemistry*, 1962, **27**, 4267-4272.

12. Anno K., Terahata H., Hayashi Y. y Seno N. "Isolation and purification of fucoidin from brown seaweed *Pelvetia wrightii*". *Agricultural and Biological Chemistry*, 1966, **30**, 495-499.
13. Kloareg B., Demarty M. y Mabeau S. "Polyanionic characteristics of purified sulphated homofucans from brown algae". *International Journal of Biological Macromolecules*, 1986, **8**, 380-386.
14. Larsen B., Haug A. y Painter T.J. "Sulphated polysaccharides in brown algae-I. Isolation and preliminary characterization of three sulphated polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol.". *Acta Chemica Scandinavica*, 1966, **20**, 219-230.
15. Percival E. "Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. Part I". *Carbohydrate Research*, 1968, **7**, 272-283.
16. Trento F., Cattaneo F., Pescador R., Porta R. y Ferro L. "Antithrombin activity of an algal polysaccharide". *Thrombosis Research*, 2001, **102**, 457-465.
17. Duarte M.E.R., Cardoso M.A., Nosedá M.D. y Cerezo A.S. "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **333**, 281-293.
18. Ribeiro A.C., Vieira R.P., Mourão P.A.S. y Mulloy B. "A sulphated  $\alpha$ -L-fucan from sea cucumber". *Carbohydrate Research*, 1994, **255**, 225-240.
19. Alves A.P., Mulloy B., Moy G.W., Vacquier V.D. y Mourão P.A.S. "Females of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* differ in the structure of their egg jelly sulphated fucans". *Glycobiology*, 1998, **8**, 939-946.
20. Hemmingson J.A., Falshaw R., Furneaux R.H. y Thompson K. "Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta)". *Journal of Applied Phycology*, 2006, **18**, 185-193.
21. Medeiros V.P., Queiroz K.C.S., Cardoso M.L., Monteiro G.R.G., Oliveira F.W., Chavante S.F., Guimaraes L.A., Rocha H.A.O. y Leite E.L. "Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: anticoagulant and anti-inflammatory properties". *Biochemistry*, 2008, **73**, 1018-1024.

22. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*". *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 2038-2047.
23. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Zhang H. y Niu X. "Structures studies on a novel fucogalactan sulphate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*". *Internatinal Journal of Biological Macromolecules*, 2010, **47**, 126-131.
24. Preeprame S., Hayashi K., Lee Jung-Bum, Sankawa U. y Hayashi T. "A novel antivirally active fucan sulfate derived from an edible brown alga, *Sargassum horneri*". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, **49**, 484-485.
25. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 153-165.
26. Croci D.O., Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., Piccoli A., Totani L., Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Usov A.I., Grachev A.A., Morozevich G.E., Berman A.E., Sanderson C.J., Kelly M., Gregorio P.D., Rossi C., Tinari N., Lacobelli S., Rabinovich G.A. y Nifantiev N.E. "Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed". *PLoS ONE*, 2011, **6**, e17283.
27. Hahn T., Lang S., Ulber R. y Muffler K. "Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae". *Process Biochemistry*, 2012, **47**, 1691-1698.
28. Whyte J.N.C. y Southcot B.A. "An extraction procedure for plants: extracts from red alga *Rhodomela larix*". *Phytochemistry*, 1970, **9**, 1159-1161.
29. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A y Usov A.I. "A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*". *Carbohydrate Research*, 1999, **320**, 108-119.
30. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L.". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 238-245.
31. El-Sayed M.M. "The polysaccharides the brown seaweed *Turbinaria murruyana*". *Carbohydrate Research*, 1982, **110**, 277-282.

32. Chandía N.P. y Matsuhiro B. "Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, **42**, 235-240.
33. Vischuk O.S., Ermakova S.P. y Zvyagintseva T.N. "Sulfated polysaccharides from brown *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity". *Carbohydrate Research*, 2011, **346**, 2769-2776.
34. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Sundukova E.V. y Elyakova L.A. "A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds". *Carbohydrate Research*, 1999, **322**, 32-39.
35. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B. y Ray B. "Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*". *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2474-2482.
36. Karmakar P., Ghosh T., Sinha S., Saha S., Mandal P., Ghosal P.K. y Ray B. "Polysaccharides from the brown seaweed *Padina tetrastratica*: characterization of a sulfated fucan". *Carbohydrate Polymers*, 2009, **78**, 416-421.
37. Mohamed S.F. y Agili F.A. "Antiviral sulphated polysaccharides from brown algae *Padina pavonia*: characterization and structure elucidation". *International Journal Chemtech Research*, 2013, **5**, 1469-1476.
38. Beress A., Wassermann O., Bruhn T., Beress L., Kraiselburd E.N., Gonzales L.V., G.E. de Motta y Chavez P.I. "A new procedure for the isolation of anti-HIV compounds (polysaccharides and polyphenols) from the marine alga *Fucus vesiculosus*". *Journal of Natural Products*, 1993, **56**, 478-488.
39. Rocha H.A.O., Moraes F.A., Trindade E.S., Franco C.R.C., Torquato R.J.S., Veiga S.S., Valente A.P., Mourão P.A.S., Leite E.L., Nader H.B. y Dietrich C.P. "Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent?". *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 41278-41288.
40. Larsen B., Haug A. y Painter T.J. "Sulphated polysaccharides in brown algae. III. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*". *Acta Chemical Scandinavica*, 1970, **24**, 3339-3352.

41. Reviere B.D. "Fucans and alginates without phenolic compounds". *Journal of Applied Phycology*, 1989, **1**, 75-76.
42. Nishino T., Nishioka C., Ura H. y Nagumo T. "Isolation and partial characterization of a novel aminosugar-containing fucan sulphate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan". *Carbohydrate Research*, 1994, **255**, 213-224.
43. Chandia N.P., Matsuhira B., Ortiz J.S. y Mansilla A. "Carbohydrates from the sequential extraction of *Lessonia vadosa* (Phaeophyta)". *Journal of Chilean Chemical Society*, 2005, **50**, 501-504.
44. Percival E. y Young M. "Carbohydrates of the brown seaweeds. Part III. *Desmarestia aculeata*". *Carbohydrate Research*, 1974, **32**, 195-201.
45. Percival E.E., Venega M.F. y Weigel H. "Carbohydrates of the brown seaweed *Lessonia nigrescens*". *Phytochemistry*, 1983, **22**, 1429-1432.
46. Lee J.-B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T. y Hayashi T. "Novel Antiviral Fucoidan from Sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu)". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, **52**, 1091-1094.
47. Hoagland D.R. y Lieb L. "The complex carbohydrates and forms of sulphur in marine algae of the Pacific coast". *Journal of Biological Chemistry*, 1915, **23**, 287-297.
48. Nelson W.L. y Cretcher L.H. "The carbohydrate acid sulfate of *Macrocystis pyrifera*". *Journal of Biological Chemistry*, 1931, **94**, 147-154.
49. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L.". *Carbohydrate Research*, 2004, **339**, 511-517.
50. Zhu W., Ooi V.E.C., Chan P.K.S. y Ang P.O. "Isolation and characterization of sulphated polysaccharide from brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity". *Biochemistry and Cell Biology*, 2003, **81**, 25-33.
51. Kantachumpoo A. y Chirapart A. "Components and antimicrobial activity of polysaccharides extracted from Thai brown seaweeds". *Kasetsart Journal of Natural Science*, 2010, **44**, 220- 233.
52. Shinha S., Astani A., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity". *Phytochemistry*, 2010, **71**, 235-242.

53. Lee J.-B., Takeshita A., Hayashi K. y Hayashi T. "Structures and activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*". *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**, 995-999.
54. Jin W., Zhang W., Wang J., Ren S., Song N., Duan D. y Zhang Q. "Characterization of laminaran and highly sulfated polysaccharide from *Sargassum fusiforme*". *Carbohydrate Research*, 2014, **385**, 58-64.
55. Marais M.-F. y Joseleau J.-P. "A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **336**, 155-159.
56. Foley S.A., Mulloy B. y Tuohy M.G. "An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro". *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1851-1861.
57. Chattopadhyay N., Ghosh T., Sinha S., Chattopadhyay K., Karmakar P. y Ray B. "Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: structural features and antioxidant capacity". *Food Chemistry*, 2010, **118**, 823-829.
58. Li B., Wei X.J., Sun J.L. y Xu S.-Y. "Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 1135-1146.
59. Rodriguez-Jasso R.M., Mussatto S.I., Pastrana L., Aguilar C.N. y Teixeira J.A. "Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed". *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**, 1137-1144.
60. Nishino T., Takake Y. y Nagumo T. "Isolation and partial characterization of a novel  $\beta$ -D-galactan sulfate from the brown seaweed *Laminaria angustata* var. *lingissima*". *Carbohydrate Polymers*, 1994, **23**, 165-173.
61. Wang H., Vincent E. y Ang P.O. "Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds". *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, **9**, 969-976.
62. Lee Y.K., Lim D.-J., Lee Y.-H. y Park Y.I. "Variations in fucoidan contents and monosaccharide compositions of Korean *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar (Phaeophyta)". *Algae*, 2006, **21**, 157-160.
63. Synytsya A., Kim W.-J., Kim S.-J., Kim S.-M., Pohl R., Synytsya A., Kvasnička F., Capíková J. y Park Y.I. "Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*". *Carbohydrate Polymers*, 2010, **81**, 41-48.

64. Awad N.E., Motawe H.M., Selim M.A. y Matloub A.A. "Antitumorigenic polysaccharides isolated from the brown algae, *Padina pavonia* (L.) Gaill. and *Hydroclathrus clathratus* (C. Agardh) Howe". *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2009, **3**, 6-11.
65. Percival E., Rahman A. y Weigel H. "Chemistry of the polysaccharides of the brown seaweed *Dictyopteris plagiogramma*". *Phytochemistry*, 1981, **20**, 1579-1582.
66. Feldman S.C., Reynaldi S., Stortz C.A., Cerezo A.S. y Damonte E.B. "Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*". *Phytomedicine*, 1999, **6**, 335-340.
67. Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S. y Yokokura T. "Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida". *Glycoconjugate Journal*, 1999, **16**, 19-26.
68. Bilan M.I., Vinogradova E.V., Tsvetkova A., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "A sulfated glucuronofucan containing both fucofuranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*". *Carbohydrate Research*, 2008, **343**, 2605-2612.
69. Bandyopadhyay S.S., Heidary M., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*". *Phytochemistry*, 2011, **72**, 276-283.
70. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.-D. y Fouad T. "Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichotoma*". *Phytochemistry*, 1978, **17**, 741-743.
71. Manivannan K., Thirumaran G., Karthikai G., Anantharaman P. y Balasubramanian T. "Proximate composition of different group of seaweeds from Vedalai coastal waters (Gulf of Mannar): Southeast coast of India". *Middle-East Journal Science Research*, 2009, **4**, 72-77.
72. Leite E.L., Medeiros M.G.L., Rocha H.A.O., Farias G.G.M., Da Silva L.F., Chavante S.F., de Abreu L.D., Dietrich C.P. y Nader H.B. "Structure and pharmacological activities of a sulfated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*". *Plant Science*, 1998, **132**, 215-228.

73. Al-Amoudi O.A., Mutawie H.H., Patel A.V. y Blunden G. "Chemical composition and antioxidant activities of Jeddah cornice algae, Saudi Arabia". *Saudi Journal of Biological Science*, 2009, **16**, 23-29.
74. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.M. y Salem H.M. "Studies of the purification and some properties of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*". *Carbohydrate Research*, 1974, **33**, 9-17.
75. Gamal-Eldeen A.M., Ahmed E.F. y Abo-Zeid M.A. "In vitro cancer chemopreventive properties of polysaccharide extract from the brown alga, *Sargassum latifolium*". *Food and Chemical Toxicology*, 2009, **47**, 1378-1384.
76. Venkateswaran P.S., Millman I. y Blumberg B.S. "Interaction of fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with surface antigens of Hepatitis B and woodchuck Hepatitis viruses". *Planta Medica*, 1989, **55**, 265-270.
77. Chevotot L., Foucault A., Chaubet F., Kervarec N., Siquin C., Fisher A.-M. y Boisson-Vidal C. "Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity". *Carbohydrate Research*, 1999, **319**, 154-165.
78. Ye H., Wang K., Zhou C., Liu J. y Zheng X. "Purification, antitumor and antioxidant activities in vitro of polysaccharides from the brown seaweed *Sargassum pallidum*". *Food Chemistry*, 2008, **111**, 428-432.
79. Cote R.H. "Disaccharides from fucoidan". *Journal of the Chemical Society*, 1959, 2248-2254.
80. Conchie J. y Percival E.G.V. "Fucoidin. Part II. The hydrolysis of a methylated fucoidin prepared from *Fucus vesiculosus*". *Journal of the Chemical Society*, 1950, 827-832.
81. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L. y Clark G.F. "A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities". *Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 21770-21776.
82. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag.". *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 719-730.

83. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.M. y Salem H.M. "Some structural features of sargassan, a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifolium*". *Carbohydrate Research*, 1974, **33**, 19-24.
84. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Thu T.T., Thanh T.T., Minh B., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Preliminary investigation of a highly sulphated galactofucan fraction isolated from brown alga *Sargassum polycystum*". *Carbohydrate Research*, 2013, **377**, 48-57.
85. Hussein M.M., Abdel-Aziz A. y Salem H.M. "Sulfated heteropolysaccharides from *Padina pavonia*". *Phytochemistry*, 1980, **19**, 2131-2132.
86. Miller I.J. y Blunt J.W. "Two fucoidans: structural constancy and variation". Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Seaweed Symposium, Cape Town, South Africa, 2003, pp. 221-227.
87. Percival E. "The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function". *British Phycological Journal*, 1979, **14**, 103-117.
88. Atkins E.D.T., Mackie W., Nieduszynski I.A., Parker K.D. y Smolko E.E. "Structural components of algínic acid. Part. I. The crystalline structure of poly- $\beta$ -D-mannuronic acid. Results of X-ray diffraction and polarized infrared studies". *Biopolymers*, 1973, **12**, 1865-1878.
89. Atkins E.D.T., Mackie W., Nieduszynski I.A., Parker K.D. y Smolko E.E. "Structural components of algínic acid. Part II. The crystalline structure of poly  $\alpha$ -L-guluronic acid. Results of X-ray diffraction and polarized infrared studies". *Biopolymers*, 1973, **12**, 1879-1887.
90. Davis T., Volesky B. y Mucci A. "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae". *Water Research*, 2003, **37**, 4311-4330.
91. Haug A., Myklestad S., Larsen B. y Smidsrod O. "Correlation bewteen chemical structure and physical properties of alginates". *Acta Chemica Scandinavica*, 1967, **21**, 768-778.
92. Rees D.A. "Shapely polysaccharides". *Biochemical Journal*, 1972, **126**, 257-273.
93. Haug A. y Larsen B. "Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates". *Acta Chemica Scandinavica*, 1962, **16**, 1908-1918.

94. Vadas L., Prihar H.S., Pugashetti B.K. y Feingold D.S. "A gas chromatographic method for the quantitative determination of hexuronic acids in alginic acid". *Analytical Biochemistry*, 1981, **114**, 294-298.
95. Morris E.R., Rees D.A. y Thom D. "Characterisation of alginate composition and block-structure by circular dichroism". *Carbohydrate Research*, 1980, **81**, 305-314.
96. Grasdalen H., Larsen B. y Smidsrod O. "A n.m.r. study of the composition and sequence of uronate residues in alginates". *Carbohydrate Research*, 1979, **68**, 23-31.
97. Moe S.T., Drage K.I., Skajak-Bræk G. y Smidsrød O. "Food polysaccharides and their applications". Stephen A. (ed.), Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 245-260.
98. Usov A.I., Bilan M.I y Klochkova N.G. "Polysaccharide of algae 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae)". *Botanica Marina*, 1995, **38**, 43-51.
99. Grant G.T., Morris E.R., Rees D.A., Smith P.J.C. y Thom D. "Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model". *FEBS Letters*, 1973, **32**, 195-198.
100. Volesky B. "Sorption and Biosorption", McGill University, Montreal, Canada, 2003, pp. 1-120.
101. Stortz C.A "Polisacáridos de algas pardas: ácido algínico y alginatos" en "Macroalgas de interés económico: Cultivo, Manejo, Industrialización". Ferrario M.E. y Sar E. (eds.), Editorial de la Universidad Nacional de la Plata, Argentina, 1996, Cap. 1, pp. 151-171.
102. Orive G., Ponce S., Hernández R.M., Gascón R.M., Igartua M. y Pedraz J.L. "Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates". *Biomaterials*, 2002, **23**, 3825-3831.
103. Pereira L., Sousa A., Coelho H., Amado A.M. y Ribeiro-Claro P.J.A. "Use of FTIR, FT-Raman and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids". *Biomolecular Engineering*, 2003, **20**, 223-228.

104. Mao W., Li B., Gu Q., Fang Y. y Xing H. "Preliminary studies on the chemical characterization and antihyperlipidemic activity of polysaccharide from the brown alga *Sargassum fusiforme*". *Hydrobiologia*, 2004, **512**, 263-266.
105. Romanos M.T.V., Andrade-Serpa M.J., Dos Santos M.G.M., Ribeiro A.C.F., Yoneshigue-Valentin Y., Costa S.S. y Wigg M.D. "Inhibitory effects of extracts of Brazilian marine algae on human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation in vitro". *Cancer Investigation*, 2002, **20**, 46-54.
106. Percival E. y McDowell R.H. "Sulphated polysaccharides containing neutral sugars: 2" in "*Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*", Academic Press: New York, USA. 1967, Cap 7, pp. 157-174.
107. Rupérez P., Ahrazem O. y Leal J.A. "Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from edible brown seaweed *Fucus vesiculosus*". *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 840-845.
108. Finch P., Percival E., Slaiding I.R. y Weigel H. "Carbohydrates of the Antarctic brown seaweed *Ascoseira mirabilis*". *Phytochemistry*, 1986, **25**, 443-448
109. Carlberg G.E., Percival E. y Rhaman M.A. "Carbohydrates of the seaweeds, *Desmarestia ligulata* and *D. firma*". *Phytochemistry*, 1978, **17**, 1289-1292.

## **Capítulo 3**

---

# **Actividad antiviral de los fucoidanos**

---

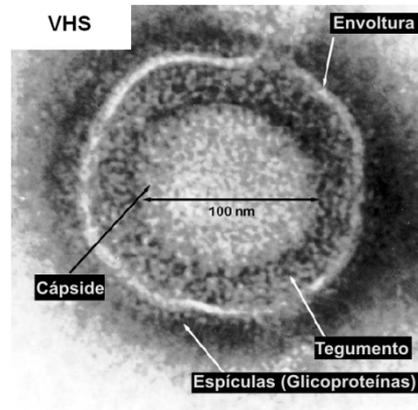
## **3.1. Herpesvirus**

### **3.1.1. Introducción**

La familia *Herpesviridae* comprende más de 130 miembros que tienen en común poseer un genoma ADN de doble cadena lineal, una cápside de simetría icosaédrica y una envoltura lipídica<sup>1</sup>. Poseen una amplia distribución en el reino animal y se estima que estos virus son patógenos ancestrales que han co-evolucionado con las especies que infectan por más de 200 millones de años<sup>2</sup>.

### **3.1.2. Características estructurales**

El genoma de los Herpesvirus posee unos  $8-15 \times 10^7$  Da de peso molecular, codifica para unos 100-200 potenciales marcos de lectura abierta u ORFs (del inglés, *open reading frames*) y está comprendido en una cápside de 100-110 nm de diámetro. La cápside es de simetría icosaédrica y posee envoltura lipídica. En la superficie posee espículas relativamente más numerosas y cortas que las halladas en otros virus. Las glicoproteínas que las componen proporcionan importantes determinantes antigénicos que distinguen a los miembros individuales dentro de cada grupo. Entre la nucleocápside y la envoltura hay un área densa al microscopio electrónico denominada tegumento. Se le asigna una estructura ordenada y el contenido de proteínas que son importantes para controlar las funciones de la célula huésped en forma inmediata a su penetración. El diámetro del virión completo es de aproximadamente 120-300 nm, dependiendo del tipo de virus y de la preparación utilizada para su examinación en el microscopio electrónico<sup>1</sup> (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Estructura del virus Herpes simplex. (Wagner E.K. Adaptado de <http://www.dbc.uci.edu/~faculty/wagner/hsvstructure.html>).

### **3.1.3. Características infectivas**

Los Herpesvirus se caracterizan porque luego de la infección inicial establecen una infección de tipo latente que persiste durante la vida del huésped. En el estado latente, solo un pequeño número de genes virales son expresados. La reactivación, con expresión de proteínas y producción de progenie viral, puede ocurrir a intervalos de tiempo para producir infecciones recurrentes. Esto le permite al virus transmitirse a nuevos huéspedes susceptibles.

En general, los miembros individuales están bien adaptados a su especie hospedadora y exhiben poca o ninguna habilidad de causar infección interespecies. Los Herpesvirus también se caracterizan por codificar varias enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos (por ej., timidina quinasa, ADN polimerasa, ribonucleótido quinasa) y para la modificación postraduccional de algunas de sus proteínas (proteína quinasa) que pueden servir como blancos farmacológicos terapéuticos.

Como en casi todos los virus ADN, su replicación y ensamblado ocurre en el núcleo de la célula huésped y la cápside adquiere su envoltura en el tránsito a través de la membrana nuclear. La célula huésped resulta destruída con frecuencia como consecuencia de la infección.

Varios Herpesvirus poseen fuerte asociación con el proceso de oncogénesis siendo las más notables la asociación del Herpesvirus humano 4 (virus Epstein-Barr) con el carcinoma nasofaríngeo y el linfoma de Burkitt, y el Herpesvirus humano 8 con el sarcoma de Kaposi y el linfoma de células B de la cavidad abdominal en pacientes con SIDA<sup>1</sup>.

#### **3.1.4. Clasificación**

El grupo de estudio de los Herpesvirus del *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) dividió a los Herpesvirus en 3 grandes subfamilias: los alpha, beta y gamma Herpesvirus, basados en sus diferentes propiedades biológicas (Tabla 3.1). Esta clasificación fue realizada antes de que la secuencia de ADN de sus miembros fuera conocida. El grupo de estudio subsecuentemente clasificó a un pequeño número de Herpesvirus en géneros basados en parámetros más objetivos, tales como la conservación de genes, y su posición relativa en el genoma, la presencia y distribución de nucleótidos que pueden ser sujetos a metilación, y los reordenamientos de secuencias genómicas.

Una nomenclatura formal binomial no es actualmente utilizada en la clasificación de los Herpesvirus. El ICTV<sup>3</sup> estableció que los Herpesvirus deben ser descritos por números seriales y la familia o subfamilia en la que el huésped es clasificado. Por ej.: Herpesvirus cercopitecino 1.

Cada subfamilia es dividada en una serie de géneros. La subfamilia *Alphaherpesvirinae* contiene 2 géneros: Simplexvirus, ejemplificado por Herpesvirus humano 1 y Varicellovirus, ejemplificado por Herpesvirus humano 3. La subfamilia *Betaherpesvirinae* contiene 3 géneros: Cytomegalovirus, ejemplificado por Herpesvirus humano 5 (cytomegalovirus humano); Muromegalovirus, ejemplificado por Herpesvirus múrido 1; y Roseolovirus, ejemplificado por herpesvirus humano 6. La subfamilia *Gammaherpesvirinae* contiene 2 géneros: Lymphocriptovirus, ejemplificado por Herpesvirus humano 4 (virus Epstein-Barr); y Rhadinovirus, ejemplificado por Samiirine Herpesvirus 2.

### 3.1. Características de las subfamilias de los Herpesvirus.

<b>Propiedades comunes</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Genoma de ADN de doble cadena grande y lineal.</li><li>- Síntesis de ADN y ensamblaje de la cápside dentro del núcleo, adquiere envoltura por pasaje a través de la membrana nuclear.</li><li>- Tienen una gran variedad de enzimas específicas implicadas en el metabolismo del ácido nucleico y su síntesis.</li><li>- La replicación resulta en la destrucción de la célula huésped.</li><li>- Establecen latencia en el huésped.</li></ul>
<b>Alphaherpesvirinae</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Rango de huéspedes variable.</li><li>- Ciclo reproductivo más corto.</li><li>- Propagación rápida.</li><li>- Destrucción de células infectadas.</li><li>- Establece latencia principalmente en los ganglios sensoriales.</li></ul>
<b>Betaherpesvirinae</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Gama de huéspedes restringida.</li><li>- Ciclo reproductivo más largo.</li><li>- Propagación lenta.</li><li>- Latencia en glándulas secretoras, células linforreticulares, y riñones.</li></ul>
<b>Gammaherpesvirinae</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Rango experimental del hospedero limitado a la familia.</li><li>- Replicación viral en células linfoblastoides.</li><li>- Latencia en linfocitos T o B.</li></ul>

Actualmente, 9 miembros de la familia *Herpesviridae* son conocidos por infectar al ser humano (Tabla 3.2). Estos virus poseen distribución mundial y carecen de animales reservorios. El nombre oficial, acorde a ICTV, es *Human Herpesviruses 1-8* (HHV1-8), sin embargo son más conocidos por sus nombres vernáculos (comunes)<sup>4</sup>.

**Tabla 3.2. Clasificación de los Herpesvirus humanos**

<b>Nombre oficial</b>	<b>Subfamilia</b>	<b>Género</b>	<b>Nombre común y abreviación</b>
Herpesvirus humano 1	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Simplexvirus	Herpes simplex virus 1 (HHV1)
Herpesvirus humano 2	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Simplexvirus	Herpes simplex virus 2 (HHV2)
Herpesvirus humano 3	<i>Alphaherpesvirinae</i>	Varicellovirus	Herpes varicella zoster virus (VZV)
Herpesvirus humano 4	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	Epstein–Barr virus (EBV)
Herpesvirus humano 5	<i>Betaherpesvirinae</i>	Cytomegalovirus	Cytomegalovirus humano (CMV)
Herpesvirus humano 6A	<i>Betaherpesvirinae</i>	Roseolovirus	HHV6A
Herpesvirus humano 6B	<i>Betaherpesvirinae</i>	Roseolovirus	HHV6B
Herpesvirus humano 7	<i>Betaherpesvirinae</i>		HHV7
Herpesvirus humano 8	<i>Gammaherpesvirinae</i>	Rhadinovirus	Herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi (KSHV)

### **3.2. Herpesvirus humano 1**

El hombre es el único huésped natural y la infección puede producir síntomas que van desde lo trivial hasta enfermedades muy severas. Durante la infección el virus establece latencia en el núcleo de neuronas del ganglio dorsal local. A intervalos variables en la vida del huésped puede reactivarse y producir replicación viral con o sin

síntomas. En individuos inmunocomprometidos, tanto la infección original como las recurrencias pueden ser muy graves.

### **3.2.1. Ciclo de replicación**

Posee un ciclo de replicación corto (18-24 h), que es citolítico. La unión inicial y la penetración de la célula huésped están mediadas a través de las glicoproteínas de las espículas de la envoltura del virus. Al menos 4 de las 11 glicoproteínas del virión son esenciales para la entrada y salida del virus en la célula infectada. La unión inicial de HHV1 se establece por la glicoproteína C (y en menor medida por la glicoproteína B) (Figura 3.2).

Estas glicoproteínas se unen al heparán sulfato de los glicosaminoglicanos de la superficie celular o, en las células que carecen de heparán sulfato, a otros proteoglicanos como el condroitin sulfato. La unión inicial es seguida por la unión de la glicoproteína D a un co-receptor variable. La unión a la célula huésped activa un proceso que induce una fusión (independiente del pH) de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula. Este proceso involucra probablemente casi todas las glicoproteínas de la superficie del virión. Como resultado, las proteínas del tegumento y la nucleocápside viral ingresan al citoplasma de la célula produciendo la rápida disminución del metabolismo celular. Aunque todavía no está del todo bien comprendido, hay al menos al menos 12 proteínas del tegumento a las que se les asigna este efecto así como la unión de la nucleocápside al poro nuclear y la posterior liberación del ADN viral dentro del núcleo, donde inmediatamente se circulariza. Para iniciar la transcripción, el ADN circularizado se une a varios factores celulares para promover la expresión de genes tempranos o inmediatos<sup>1</sup>.

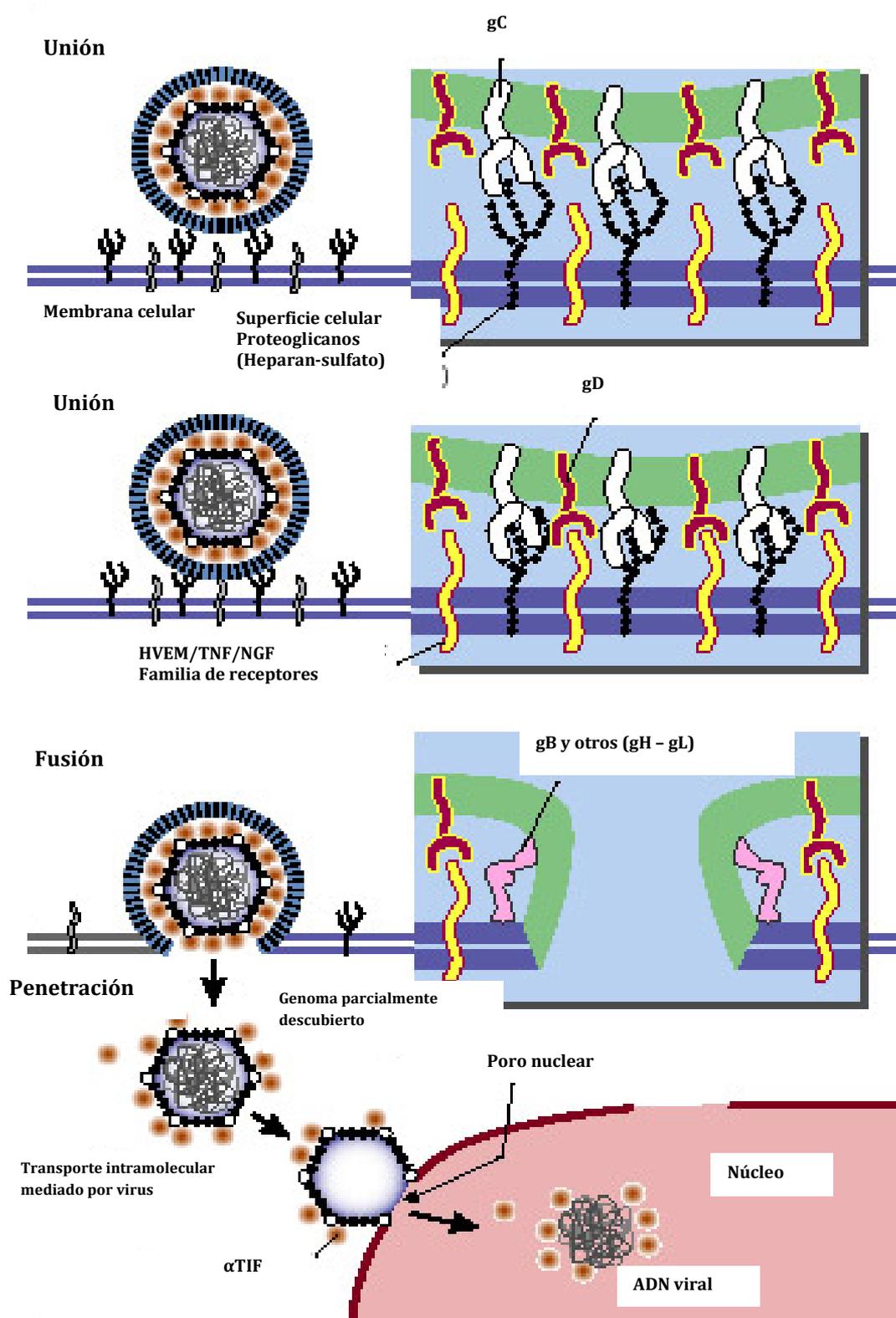


Figura 3.2. Primeros pasos en la infección viral por HHV1. Wagner E.K. Modificado de <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsvstructure.html>.

La expresión de genes virales está regulada y ordenada secuencialmente como una cascada. Los cinco productos iniciales son proteínas reguladoras, y su expresión es requerida para la producción de todos los grupos de polipéptidos posteriores.

El ADN viral se transcribe en todo el ciclo de replicación por la ARN polimerasa II del huésped. La expresión de genes más tardíos incluyen la producción de enzimas involucradas en el metabolismo del ácido nucleico, por ej., timidina quinasa y la síntesis de ADN (por ej., ADN polimerasa).

Cuando los niveles de estas proteínas son suficientes, comienza la replicación del ADN viral. La expresión temprana de genes es significativamente reducida y seguida del comienzo de la replicación de ADN, mientras un gen latente empieza a ser expresado a niveles altos. Se acepta que el ADN replica por un mecanismo circular rotatorio, que posteriormente se divide para empaquetar el genoma de ADN dentro de la nucleocápside.

La síntesis de la nucleocápside y otras proteínas estructurales ocurren a continuación. Estas son ensambladas en el núcleo con ayuda de otras proteínas. Las proteínas del tegumento también migran para formar manchas debajo de la membrana nuclear modificada. Las glicoproteínas del virus se someten a una amplia modificación postraducciona durante el tránsito a través del aparato de Golgi; luego, se insertan en las membranas nucleares. La nucleocápside madura sale a través de la membrana nuclear en este punto y adquiere su envoltura y tegumento en el proceso.

El virión es liberado de la célula infectada por el tránsito a través de la cisterna del retículo endoplasmático rugoso del aparato de Golgi y de las vesículas de transporte citoplasmáticas. La infección de la célula resulta en la destrucción de la célula huésped.

### **3.2.2. Farmacos antivirales**

En el año 1982 fue aprobado el llamado aciclovir (9-[(2-hidroxietoxi)metil]guanina), que es un análogo de la guanosina, pero con una cadena acíclica en lugar de un ciclo de la ribosa. El aciclovir difunde libremente, pero solo se activa en células infectadas.

Tanto los nucleósidos naturales como sus análogos, deben ser fosforilados a su forma

trifosfatada para participar en la replicación del ADN. El primer paso de la activación del aciclovir, es la formación del aciclovir monofosfato, la cual es catalizada por la enzima timidina quinasa viral y no por quinasas celulares, razón que explica su baja toxicidad. Luego, las enzimas celulares catalizan el proceso hacia la forma trifosfatada del aciclovir. Durante la replicación del ADN, el aciclovir trifosfato compite con el sustrato natural dGTP, por la ADN polimerasa y es incorporado al ADN en crecimiento. Dado que el aciclovir es más afín a la enzima, queda incorporado preferencialmente a la cadena nascente de ADN. La cadena del aciclovir posee un hidroxilo análogo al 5' de la guanosina, que se puede fosforilar, pero carece del hidróxilo 3' presente en el sustrato natural, por lo que el nucleótido siguiente no se puede unir y se detiene la replicación del ADN. Este fenómeno se conoce como terminación obligada de la cadena. Además, el aciclovir se une irreversiblemente a la polimerasa viral, inactivándola completamente. Se ha observado resistencia al aciclovir, vinculada con la producción parcial o nula de timidina quinasa viral, alteración de la especificidad del sustrato de la timidinquinasa (como sería fosforilación de la timidina, pero no del aciclovir) o alteración de la ADN polimerasa viral. Las mutaciones de las enzimas virales son causadas por mutaciones puntuales o inserciones o deleciones de bases en los genes correspondientes.

Es por ello que se buscaron compuestos más eficaces que el aciclovir para su uso alternativo. En la actualidad se utilizan tres derivados del aciclovir como el valaciclovir (9-(4-acetoxi-3-acetoximetil-1-butil)guanina), ganciclovir (9-[(1,3-dihidroxi-2-propoxi)metil]guanina) y famciclovir (diacetil-6-dioxi-penciclovir) los cuales ofrecen mejor biodisponibilidad luego de una administración oral<sup>5</sup>.

### **3.3. Coxsackievirus**

#### **3.3.1. Introducción**

Los coxsackievirus (CV) poseen distribución mundial y utilizan el tracto entérico como sitio primario de replicación, y por lo tanto, se transmiten por la vía fecal-oral. La mayoría de las infecciones que producen son subclínicas, pero en ocasiones provocan graves enfermedades como miocarditis, principalmente en niños y en personas

inmunocomprometidas. En general, se asocian a enfermedades agudas pero también se han asociado a enfermedades crónicas como cardiomiopatía dilatada y diabetes mellitus<sup>6</sup>. Los CV deben su nombre a que los primeros aislamientos fueron realizados en 1948 en dos personas que sufrían de parálisis en la ciudad de Coxsackie, en el estado de Nueva York, Estados Unidos<sup>6</sup>.

### **3.3.2. Características estructurales**

Los CV son virus no envueltos, con una cápside de 30 nm de diámetro que rodea al ARN. La cápside posee simetría icosaédrica, y está formada por 60 copias de cada una de las cuatro proteínas virales estructurales, VP1 a VP4. VP1, VP2 y VP3 forman la superficie externa del virus, mientras que VP4 se ubica en el interior de la cápside (Figura 3.3).

Las mayores diferencias entre los distintos CV se encuentran en las regiones más y menos expuestas a la superficie de los viriones, que definen los principales sitios antigénicos y los sitios de unión a receptores, respectivamente<sup>7</sup>. Los CV poseen un genoma de ARN de simple hebra de polaridad positiva de aproximadamente 7500 nucleótidos con una proteína unida (VPg) en el extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'<sup>6</sup>. El genoma se divide en tres regiones: P1, P2 y P3. La región P1 codifica para proteínas de la cápside o estructurales, mientras que P2 y P3 codifican para proteínas no estructurales<sup>6</sup>.

Para superar la limitación de un genoma monocistrónico en la producción de una gran variedad de productos proteicos, los CV utilizan la actividad proteolítica de dos cisteínas proteasas codificadas por el virus, 2A y 3C, para escindir la poliproteína de una manera altamente específica (Figura 3.4).

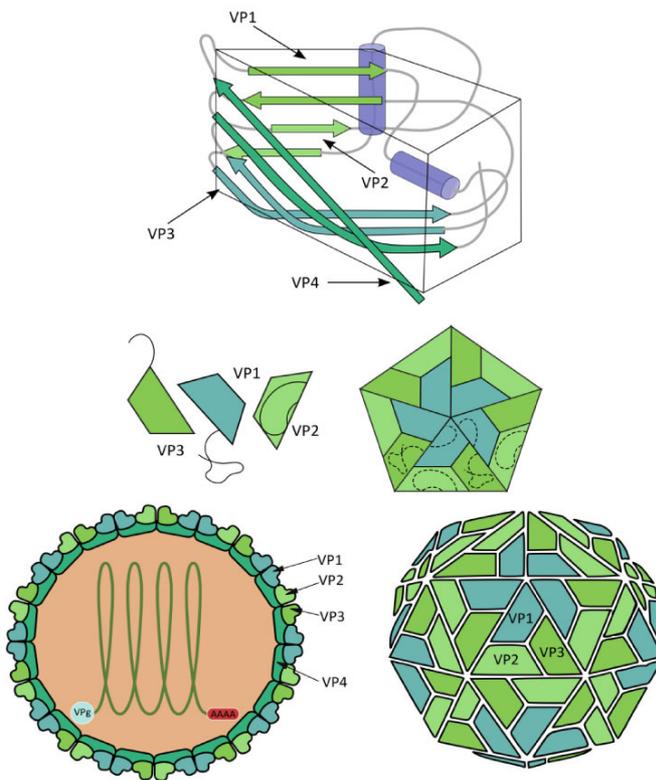
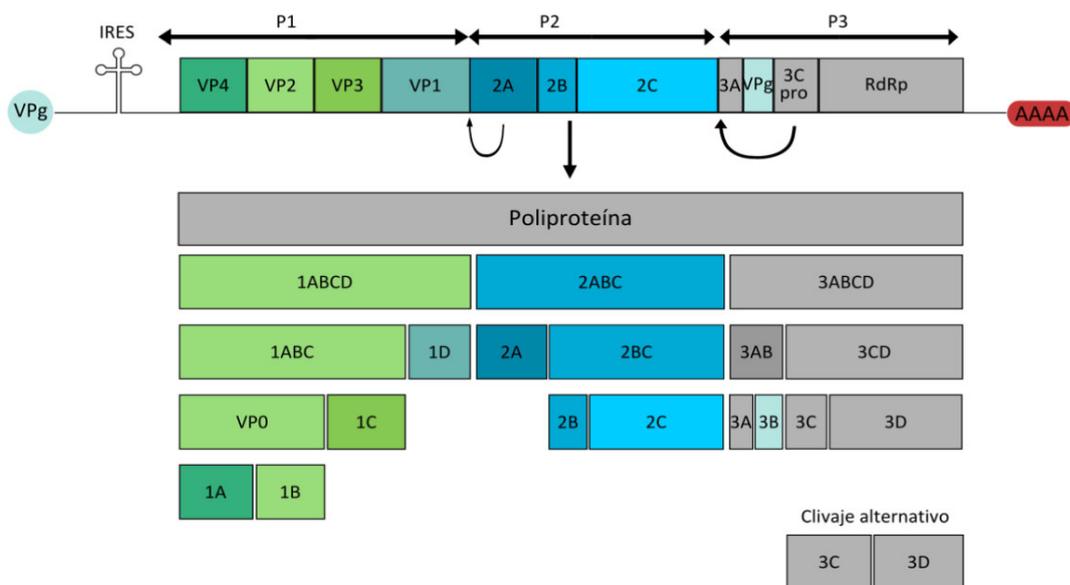


Figura 3.3. Estructura de un virus Coxsackie.



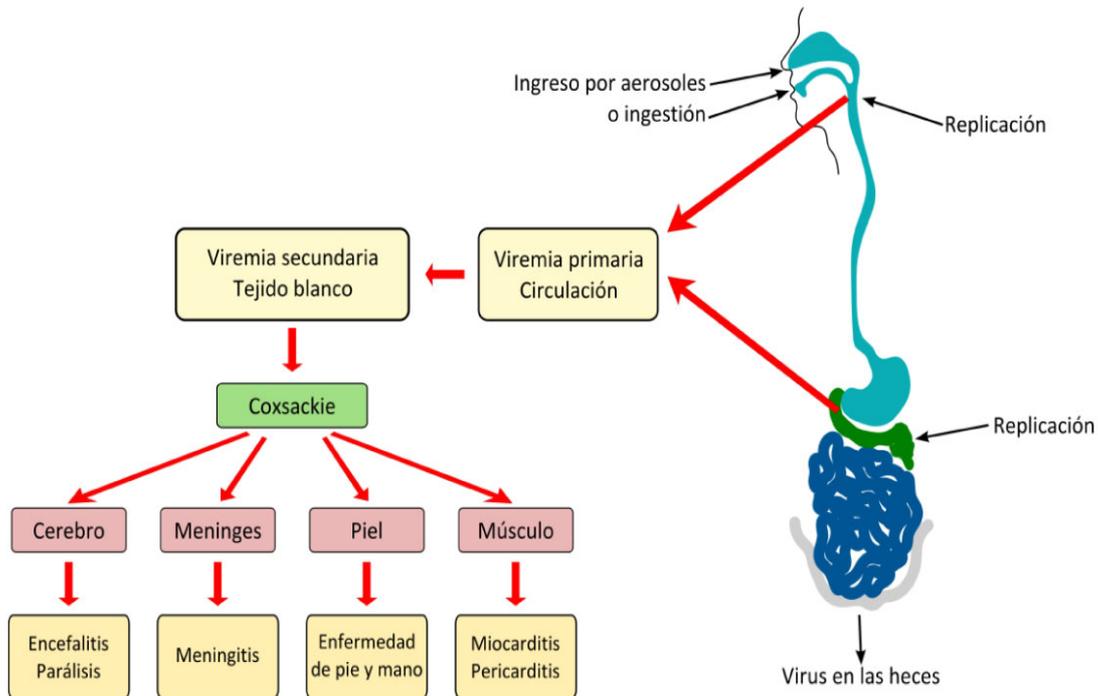
P1 = 1ABCD; P2 = 2ABC; P3 = 3ABCD; 1A= VP4; 1B = VP2; 1C = VP3  
 1D = VP1; 3B = VPg; 3D = RdRp

Figura 3.4. Esquema del genoma viral y su procesamiento postranscripcional.

### **3.3.3. Características infectivas**

Los CV son patogénicos en ratones recién nacidos y han sido divididos en A y B acorde produzcan inflamación y necrosis difusa en el músculo esquelético (CVA) o miositis focalizada y necrosis en el encéfalo, páncreas, grasa parda y miocardio (CVB), de los animales infectados. Los distintos serotipos de CVB se han asociado a enfermedades similares en humanos. Hasta el presente, no existe un tratamiento específico para las infecciones con CVB y solo puede realizarse cierta prevención con medidas de higiene básicas.

Los CV generalmente ingresan al cuerpo por la ruta oral e infectan células de la mucosa orofaríngea y el tejido linfoide (amígdalas) donde se replican y se distribuyen en el tracto digestivo. Debido a su estabilidad a pH ácido, estos virus pueden atravesar el estómago y establecer infecciones en la mucosa intestinal y en el tejido linfoide, desde donde es eliminado en las heces. Durante la infección, ocurre una viremia “menor” con invasión subsiguiente del sistema retículo endotelial. En la fase de viremia primaria, el virus también ingresa al torrente sanguíneo a bajos niveles, lo que puede ocasionar una viremia “mayor” que permitiría al virus alcanzar el tejido blanco (Figura 3.5). Más del 95% de los individuos infectados con enterovirus controlan la infección con anterioridad a la viremia “mayor” desarrollando una infección asintomática, aún cuando la eliminación del virus por materia fecal persista por semanas<sup>6</sup>.



**Figura 3.5** Etapas de la infección de los CV.

### 3.3.4. Clasificación

Los CV pertenecen al género *Enterovirus*, familia *Picornaviridae* que esta compuesta por los generos aftovirus, cardiovirus, enterovirus y rinovirus. Los dos primeros son virus patógenos de animales, a diferencia de los enterovirus y rinovirus, donde algunos serotipos son patógenos humanos y otros para animales. Como ya se mencionó, los CV se han dividido en CVA y CVB. A su vez, los CVB incluyen serotipos del 1 al 6. Actualmente, los CV se hallan incluidos dentro de los dos diferentes grupos, los enterovirus humanos A y B<sup>8</sup>.

## 3.4. Coxsackievirus B3

### 3.4.1. Ciclo de replicación

El primer paso en el ciclo de replicación es la adsorción y penetración. La infección empieza cuando la partícula viral se une a los receptores de la superficie celular. Para la infección por CVB, se encuentran descritos dos receptores: CAR (del inglés, *coxsackie adenovirus receptor*) y DAF (del inglés, *decay accelerating factor*) o CD-55<sup>9,10</sup>.

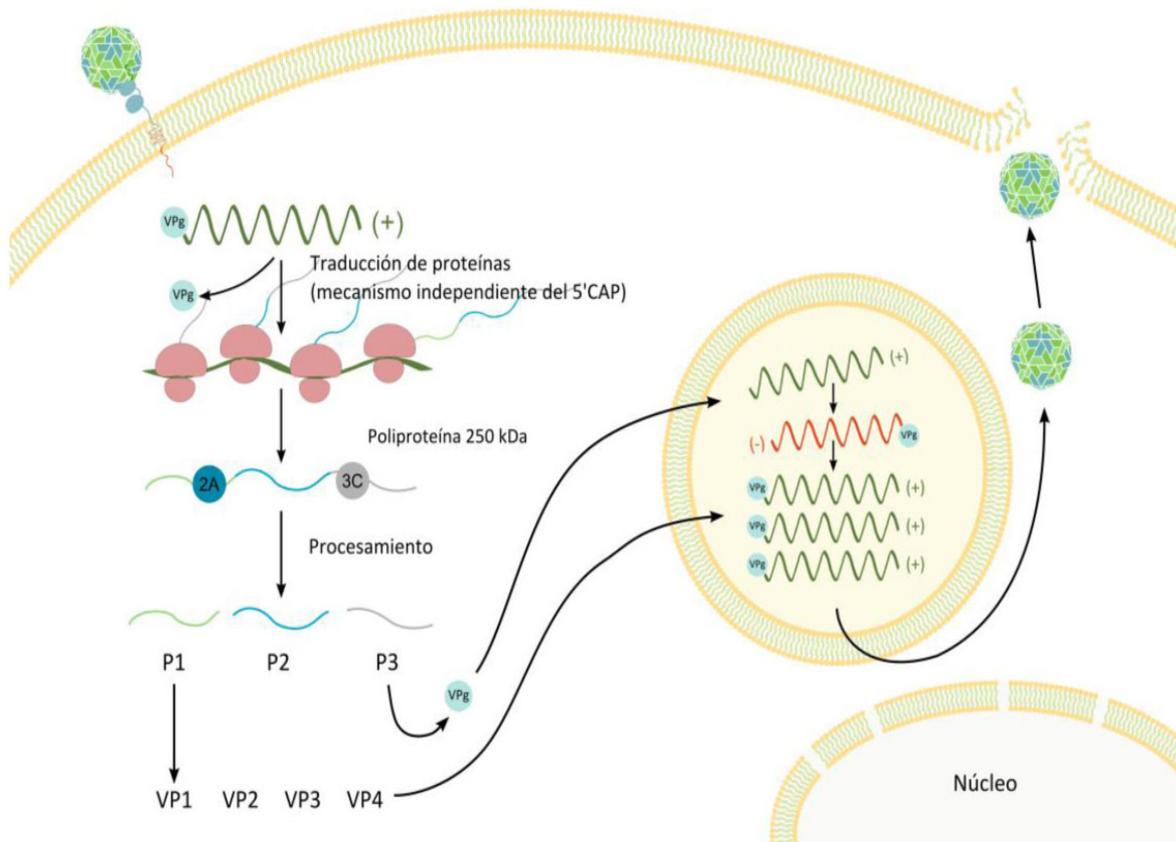
Los 6 serotipos de CVB se unen a CAR para ingresar a las células e infectarlas, mientras que algunos CVB también se unen a DAF; sin embargo, esta interacción por sí sola no es suficiente para la internalización del virus. El mecanismo de internalización del virus dentro del citoplasma de la célula blanco, donde transcurre todo el ciclo de replicación, parecería depender del tipo de célula<sup>11</sup>.

La traducción del ARN viral se realiza por un mecanismo independiente del característico de los ARNm eucariotas ya que poseen una secuencia 5' denominada IRES (del inglés, *internal ribosome entry site*) que permite la entrada al ribosoma y la traducción independiente de eIF4F. Más aún, la proteasa viral 2A cliva el factor eIF4G, que forma parte del complejo eIF4F impidiendo la traducción del ARNm celular<sup>12</sup>.

La traducción procede en dirección 5' a 3', mientras que la replicación de la hebra negativa ocurre en dirección 3' a 5', siendo imposible que ambos procesos ocurran simultáneamente. Por lo tanto, la traducción viral deberá detenerse antes de que comience la replicación del ARN viral. Estos procesos requieren dos pasos de amplificación del ARN: (i) síntesis completa de la hebra negativa ARN complementaria a partir del ARN parental genómico y (ii) síntesis de la hebra positiva del ARN usando el intermediario de ARN (-) como molde, que luego puede ser utilizado para la traducción independiente del CAP o para ser empaquetado en viriones para las infecciones subsecuentes. A su vez, esta hebra hija puede ser utilizada en rondas adicionales de síntesis de la hebra negativa. La replicación correcta requiere de todas las proteínas virales en sus formas maduras y precursoras, así como de las estructurales secundarias en el ARN<sup>12</sup>. La ARN polimerasa es incapaz de copiar ARN en ausencia de un *primer* oligo (U). El ARN de los poliovirus, tanto la hebra positiva como la negativa recién sintetizadas están unidas covalentemente en su extremo 5' a la proteína VPg, que a su vez funciona como un *primer* para la síntesis de ARN<sup>13</sup>.

Las proteínas virales involucradas en la replicación pueden unirse selectivamente al ARN viral; sin embargo, hay también varias proteínas celulares involucradas en este proceso.

El desenlace más usual de la replicación viral es la muerte y destrucción celular como puede comprobarse en infecciones de células en cultivo. En las infecciones naturales, las defensas del huésped son una causa de contribución importante a la destrucción de células infectadas.



**Figura 3.6 Esquema del ciclo de replicación de los CVB.**

### 3.4.2. Farmacos anti CV

Actualmente, no existe una terapia ni vacuna específica para las infecciones contra CV. El pleconaril, que actúa bloqueando la liberación de ARN viral de la célula, fue aprobado en los 1980s; sin embargo, la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) desaprobo su uso en el año 2002 debido a los importantes efectos secundarios que producía.

### **3.5. Antecedentes de la actividad antiviral de los fucoidanos**

A pesar de la gran variedad de moléculas estudiadas en su acción antiviral, los efectos secundarios, la aparición de resistencia a las drogas, y la falta de drogas específicas en la inmensa mayoría de los casos, han hecho que continúe la búsqueda de nuevas drogas. Entre ellas resultaron de interés las provenientes de recursos naturales, como por ejemplo, las algas, como una fuente de compuestos con buenas perspectivas terapéuticas, dando lugar a numerosos estudios para evaluar la actividad de sus polisacáridos sulfatados<sup>14</sup>. Como ya se describió, la primera etapa del ciclo reproductivo del HHV1 es la unión de las glicoproteínas gC a la superficie del heparan sulfato. Un aspecto favorable a los fucoidanos es la semejanza con el heparan sulfato debida a su naturaleza polianiónica, lo cual podría hacer que estas compitan por las glicoproteínas de virus.

La capacidad de un fármaco frente a un virus se mide a través del índice de selectividad (IS), que es el cociente entre la citotoxicidad y la actividad inhibitoria ( $CC_{50}/IC_{50}$ ). A su vez, la concentración citotóxica 50 ( $CC_{50}$ ) se define como la concentración mínima del compuesto necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50%. En tanto, que la concentración mínima inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ), es la necesaria para reducir el número de virus en un 50%.

Con respecto a la acción antiherpética, dentro de la algas pardas y, a pesar de la poca cantidad de especies estudiadas, la inhibición es de moderada a alta (Tabla 3.3), considerando a un compuesto como antiviral cuando el IS es mayor que  $10^{15}$ .

**Tabla 3.3. Actividad anti HHV1 y HHV2 de diferentes especies algales.**

Especie algal	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		IS		Referencia
	HHV1	HHV2	HHV1	HHV2	
<i>Colpomenia sinuosa</i>	22,1	12,5	20,4	36,0	18
<i>Dictyota dichotoma</i>	24,3	25	38,1	24,3	18
<i>Hydroclathrus clathratus</i>	6,25	<6,25	124,8	>124,8	18
<i>Lobophora variegata</i>	18,5	9	37,8	77,8	18
<i>Padina australis</i>	58,9	40	17	25	18
<i>Sargassum hemiphyllum</i>	19,1	12,5	6,5	10	18
<i>S. marginatum</i> (F3)	3,55	0,63	>281	>1587	19
<i>S. marginatum</i> (F3-D)	50	40,77	>20	>24	19
<i>S. marginatum</i> (SmWE)	1,15	0,78	>869	>1282	19
<i>S. marginatum</i> (SmWE-D)	31,8	>50	>31	-	19
<i>Sargassum patens</i>	5,5	1,3	>727	>3076	20
<i>A. utricularis</i> (EC1)	1,32	2	>760	>500	20
<i>A. utricularis</i> (EC2)	2,90	2,47	345	405	21
<i>L. difformis</i> (Ee)	3,1	2,5	>129	>160	17
<i>L. difformis</i> (Ec)	1,1	0,6	>364	>667	17
<i>L. difformis</i> (Ea)	0,7	0,5	>571	>800	17
<i>Undaria pinnatifida</i>	1,1	0,2	-	-	17
<i>S. tenerrimum</i>	1,4	-	≥714	-	16
<i>S. tenerrimum</i> sulfatada	0,5	-	≥2000	-	16
<i>Sphacelaria indica</i> (F3)	1,3	-	154	-	22
<i>Sphacelaria indica</i> sulfatada	1,5	-	≥667	-	22

La Tabla 3.3 muestra dos aspectos importantes a considerar. El primero es la influencia de los grupos sulfato en la actividad antiviral como se puede apreciar en las especies *S. tenerrimum* cuyo IS del HHV1 de la especie extraída y sulfatada son  $\geq 714$  y  $\geq 2000$ , respectivamente<sup>16</sup> y en sentido opuesto, el fucoidano desulfatado de la especie *S. marginatum* muestra un IS tanto para el HHV1 como para HHV2 mucho menor que su producto extraído. El segundo aspecto es la influencia del solvente en la extracción. La feofita *L. difformis* fue extraída con etanol (Ee), con una solución al 2%  $\text{CaCl}_2$  (Ec) y con HCl a pH 2 (Ea), mostrando que Ea muestra el valor más alto del IS tanto en el HHV1 y HHV2, cuyos valores fueron de  $>571$  y  $>800$ , respectivamente<sup>17</sup>.

Los estudios de la acción anti-coxsackievirus en los polisacáridos de las algas pardas son sumamente escasos. Así, puede mencionarse la actividad antiviral de la feofita *Laminaria japonica* en la infección de los poliovirus, adenovirus, ECHO, CVB y CVA donde los fucoidanos de la misma pudieron inhibir el desarrollo del efecto citopático y proteger la infección en las células causada por los virus anteriores<sup>23</sup>. Por otro lado, muestras de la feofita *Undaria pinnatifida* mostraron actividad antiviral contra CV moderada sin evidenciar signos de citotoxicidad ( $>2000$ ), siendo el IS en ambos casos de  $20^{24}$ .

Se sabe que los fucoidanos han presentado actividad antiviral contra otros virus como Dengue 2 (DENV2)<sup>25</sup>, virus sincitial respiratorio<sup>26</sup>, hepatitis A (HAV)<sup>27</sup> y HIV<sup>28</sup>. Además, Lee y colaboradores<sup>24</sup> reportaron la actividad antiviral en otros virus (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4. IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> y IS descriptos para el fucoidano de *Laminaria japonica*<sup>24</sup>.**

Virus	IC <sub>50</sub> (µg/mL)		CC <sub>50</sub>	IS	
	A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>		A <sup>a</sup>	B <sup>b</sup>
HHV1	2,5	14	>2000	>800	>140
HHV2	2,6	5,1	>2000	>770	>390
HHV5	1,5	16	>2000	>1300	>125
Influenza A	15	55	>2000	>130	>36
Polio	>100	>100	>2000	20	20
CV	>100	>100	>2000	20	20

<sup>a</sup> Cuando la muestra fue añadida al medio al mismo tiempo de la infección viral.

<sup>b</sup> Cuando la muestra fue añadida al medio inmediatamente después de la infección viral.

Además, de la acción antiviral, ha sido reportado que los fucoidanos poseen actividad antioxidante, anticancerígena, inmunomodulatoria y antitrombótica.

### **3.6. Relaciones entre la estructura de los fucoidanos y la actividad antiviral**

Los fucoidanos constituyen un grupo de polisacáridos, cuyo componente principal es la fucosa, acompañado de proporciones pequeñas de otros monosacáridos como la xilosa, manosa y galactosa. Se piensa que parte de la actividad antiviral de los fucoidanos radica en impedir que los receptores celulares, como ocurre con el heparan sulfato, interactúen con los receptores virales, impidiendo de esta forma, el comienzo de la infección del virus<sup>29</sup>.

Los fucoidanos no solo necesitan un sitio de interacción específico sino también una combinación de factores estructurales que determinan la actividad antiviral, tales como:

- a) **Composición y estructura.**- No solo la composición de azúcares componentes influyen en la actividad antiviral sino también sus tipos de enlaces. Además, los fucoidanos suelen presentar mayor actividad antiviral cuanto mayor cantidad de fucosa presenten<sup>30</sup>.
- b) **Peso molecular.**- La capacidad antiviral de los polisacáridos sulfatados incrementa conforme aumenta su peso molecular.
- c) **Contenido de grupos sulfato, distribución y posición.**- La presencia de grupos aniónicos como los grupos sulfato, ya que involucra la interacción con las cargas positivas de los aminoácidos de las glicoproteínas virales. Cabe señalar que los polisacáridos altamente sulfatados (>22%) presentan las más altas actividades antivirales. Además, se sabe que no solo la proporción de los grupos sulfato afecta la actividad antiviral sino también la distribución y posición de los mismos<sup>29</sup>.
- d) **La forma de las moléculas.**- La cadena de carbohidratos sería un “carrier” y “posicionador” de los grupos aniónicos, principalmente los grupos sulfatos. Además, en la formación del complejo virus-polisacárido no solo influyen los sitios hidrofóbicos en la cadena de carbohidratos y las interacciones iónicas entre la carga negativa de los grupos sulfato y la carga positiva de los aminoácidos de la glicoproteína sino también que el virus se adapte a él<sup>29</sup>. Los polisacáridos, como los fucoidanos, galactanos y mananos a temperatura ambiente, adquieren una conformación de enrollamiento al azar (*random coil*) adquiriendo flexibilidad en los movimientos segmentales de la cadena, lo cual ha sido invocado para explicar la alta actividad antiviral de los polisacáridos. Por otro lado, las ramificaciones podrían interferir en la formación del complejo polisacárido-virus.
- e) **Sitios hidrofóbicos.**- la influencia de sitios hidrofóbicos que presentan los fucoidanos sobre los otros polisacáridos, es decir grupo metilo sobre C-5 de la fucosa presente en los fucoidanos jugarían un rol clave para presentar mayores actividades antivirales.

La actividad antiviral de fucoidanos depende de las cadenas de fucosa. Respecto de los requerimientos estructurales para la actividad antiviral se han mostrado dos tipos de estructuras mínimas de unión. Los fucanos tienen unidades de  $\alpha$ -L-fucopiranosas sulfatadas en posición 4 axial y enlazadas en posición 3 y los carragenanos (residuos de  $\beta$ -D-galactopiranosas 4-sulfato axial o 2-sulfato ecuatorial enlazadas en posición -3), no tienen complemento en las moléculas heparina/HS, y deberán ser consideradas como nuevas estructuras de unión. En estas estructuras, podrían llevarse a cabo interacciones no iónicas a través de la superficie hidrofóbica de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa de los carragenanos, la cual sobresale junto con el grupo sulfato en una configuración ordenada de tipo helicoidal. Se supone que en los fucoidanos el grupo metilo unido al carbono 5 y el hidrógeno axial, podrían jugar un rol similar<sup>29</sup>.

## Referencias

1. Roizman B. y Sears A.E. "Herpes simplex viruses and their replication" in "The human herpesviruses", Roizman B., Whitley R.J. y López C. (eds.), Raven Press Ltd., New York, USA, 1993, Cap. 2, pp. 11.
2. McGeogh D.J. y Davison A.J. "The molecular evolutionary history of the herpesviruses" in "Origins and evolution of viruses", Domingo E., Webster R. Holland J. (eds.), Academic Press, New York, USA, 1999, pp. 441-465.
3. Van Regenmortel M.V.H., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carstens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., Maniloff J., Mayo M.A., McGeoch D.J., Pringle C.R. y Wickner R.B. "Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses". The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Virus Taxonomy". VII th report of the ICTV. Academic Press, San Diego, USA, 2000.
4. Huff J.L. y Barry P.A. "B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease". *Emerging Infectious Diseases Journal*, 2003, **9**, 246-250.
5. Waugh S.M.L., Pillay D., Carrington D. y Carman W.F. "Antiviral prophylaxis and treatment (excluding HIV therapy)". *Journal of Clinical Virology*, 2002, **25**, 241-266.
6. Pallansch M.A. y Roos R.P. "Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses" in "Virology", Fields B.N., Howlwy P.M., Griffin D.E. et. al. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 589-630.
7. Hendry E., Hatanaka H., Fry E., Smyth M., Tate J., Stanway G., Santti J., Maaronen M., Hyypiä T. y Stuart D. "The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses". *Structure*, 1999, **7**, 1527-1538.
8. Stanway G., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T. y King A.M.Q. "Picornaviridae" in "Virus taxonomy", Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (eds.), VII th report of the ICTV, London, United Kingdom, Elsevier, 2004, pp. 757-778.
9. Shafren D.R., Bates R.C., Agrez M.V., Herd R.L., Burns G.F. y Barry R.D. "Coxsackieviruses B1, B3, and B5 use decay accelerating factors as a receptor for cell attachment". *Journal of Virology*, 1995, **69**, 3873-3877.

10. Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L. y Finberg R.W. "Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5". *Science*, 1997, **275**, 1320-1323.
11. Bergelson J.M. "Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread". *Cell Host & Microbe*, 2009, **5**, 517-521.
12. Sonenberg N. y Dever T.E. "Eukaryotic translation initiation factors and regulators". *Current Opinion in Structural Biology*, 2003, **13**, 56-63.
13. Racaniello V.R. "Picornaviruses and their replication" in "Virology", Fields B.N., Howley G., Griffith D.E. (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, New York, 2001, Vol. 1, pp. 589-629.
14. Leung M.Y.K., Liu C., Koon J.C.M. y Fung K.P. "Polysaccharide biological response modifiers". *Immunology Letters*, 2006, **105**, 101-114.
15. Lee J.-B., Takeshita A., Hayashi K. y Hayashi T. "Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **86**, 995-999.
16. Shinha S., Astani A., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Polysaccharides from *Sargassum tenerrimum*: Structural features, chemical modification and anti-viral activity". *Phytochemistry*, 2010, **71**, 235-242.
17. Feldman S.C., Reynaldi S., Stortz C.A., Cerezo A.S. y Damonte E.B. "Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*". *Phytomedicine*, 1999, **6**, 335-340.
18. Wang J. y Chen C. "Biosorbents for heavy metals removal and their future". *Biotechnology Advances*, 2009, **27**, 195-226.
19. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B. y Ray B. "Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*". *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2474-2482.
20. Zhu W., Ooi V.E.C., Chan P.K.S. y Ang P.O. "Isolation and characterization of sulphated polysaccharide from brown alga *Sargassum patens* and determination of its anti-herpes activity". *Biochemistry and Cell Biology*, 2003, **81**, 25-33.

21. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 153-165.
22. Bandyopadhyay S.S., Heidary M., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*". *Phytochemistry*, 2011, **72**, 276-283.
23. Li F., Tian T.C. y Shi Y.C. "Study on anti virus effect of fucoidan *in vitro*". *Norman Bethune University of Medicine and Science*, 1995, **21**, 255-257.
24. Lee J.-B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T. y Hayashi T. "Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu)". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2004, **52**, 1091-1094.
25. Hidari K.I.SP.J., Takahashi N., Arihara M., Nagaoka M., Morita K. y Suzuki T. "Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, **376**, 91-95.
26. Wang H., Vincent E. y Ang P.O. "Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds". *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, **9**, 969-976.
27. Mohamed S.F. y Agili F.A. "Antiviral sulphated polysaccharides from brown algae *Padina pavonia*: characterization and structure elucidation". *International Journal ChemTech Research*, 2013, **5**, 1469-1476.
28. Trincheros J., Ponce N.M.A., Córdoba O.L., Flores M.L., Pampuro S., Stortz C.A., Salomón H. y Turk G. "Antiretroviral activity of fucoidan extracted from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*". *Phytotherapy Research*, 2009, **23**, 707-712.
29. Damonte E.B., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents". *Current Medicinal Chemistry*, 2004, **11**, 2399-2419.
30. Venkateswaran P.S., Millman I. y Blumberg B.S. "Interaction of Fucoidan from *Pelvetia fastigia* with surface antigens of Hepatitis B and Woodchuck Hepatitis Viruses". *Planta Medica*, 1989, **55**, 265-270.

# Capítulo 4

---

## Extracción y purificación de los polisacáridos

---

## 4.1. Introducción

En las algas, los polisacáridos se clasifican en dos grandes grupos: los que forman parte de la pared celular, tejidos mucilaginosos y matriz amorfa, y los de almacenamiento o de reserva. Entre estos últimos también se encuentra el manitol, el carbohidrato de bajo peso molecular más importante. Además de este alditol, hay polisacáridos que forman parte de los elementos de reserva o de almacenamiento como el almidón, que es un glucano basado de glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), con ramificaciones en O-6 y los laminaranos, que también son glucanos pero con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3). Por otro lado, se encuentran los polisacáridos que forman parte de la pared estructural de las algas, como el alginato o sus sales, cuyos monómeros son el ácido manurónico y el ácido gulurónico, en proporciones que dependen de diversos factores incluyendo especie algal, salinidad, temperatura, estación, grado de desarrollo del alga y el fucoidano, que se basa principalmente en un desoxiazúcar como la fucosa, acompañado de proporciones menores de galactosa y xilosa; en muy pocas especies se ha encontrado manosa y glucosa y en ínfimas proporciones arabinosa y ramnosa.

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de la extracción, purificación y composición de los fucoidanos y alginatos a partir de la feofita *Dictyota dichotoma*, colectada en marzo del 2008 en las orillas de la bahía Bustamante, provincia de Chubut (Argentina).

## 4.2. Extracción del fucoidano

Sobre el alga molida, el primer solvente utilizado fue etanol acuoso al 80% a temperatura ambiente, dando lugar al extracto (EOH<sub>1</sub>) y luego de una centrifugación, el residuo se volvió a extraer en estas mismas condiciones pero a 70 °C (EOH<sub>2</sub>). En un paso posterior, el residuo fue extraído con HCl diluido a pH 2, durante 7 h a temperatura ambiente con agitación mecánica (EAR).

Este extracto, previa neutralización con bicarbonato de sodio, fue concentrado a presión reducida, dializado y liofilizado. El residuo fue extraído nuevamente con el mismo solvente pero a 70 °C de forma exhaustiva hasta que la cantidad de hidratos de

carbono en el sobrenadante fue suficientemente baja (de acuerdo a la reacción fenol-ácido sulfúrico), obteniéndose nueve extractos diferentes (EAH1-EAH9).

Posteriormente, se extrajo el alginato de sodio con carbonato de sodio al 3% sobre el residuo, por tres veces consecutivas.

A cada uno de los extractos se determinó la proporción de hidratos de carbono, proteínas, ácidos urónicos, grupos sulfato y el peso molecular por métodos colorimétricos (Tabla 4.1). Además, los extractos hidroalcohólicos fueron hidrolizados con ácido trifluoroacético (TFA) 2M, tal como se detalla en el Capítulo 7, para luego ser derivatizados a los correspondientes aldononitrilos peracetilados, mientras que después de la hidrólisis, los polisacáridos provenientes de los extractos ácidos, acuosos y el extracto alcalino, se derivatizaron a alditoles peracetilados.

En el extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente se obtuvo el mayor rendimiento de toda la secuencia extractiva (22,7%), mientras que el extraído a 70 °C, produjo un rendimiento algo menor (16,2%). Se pudo apreciar que en el extracto hidroalcohólico a temperatura ambiente la cuantificación de hidratos de carbono, proteínas y ácidos urónicos apareció como mayor que en el extracto a 70 °C. Por otro lado, los azúcares componentes mostraron que el componente mayoritario encontrado fue el manitol, mientras que se encontraron trazas de fucosa, xilosa y galactosa.

**Tabla 4.1. Análisis general de los extractos del alga *D. dichotoma* provenientes de los extractos hidroalcohólicos y acídicos.**

	<b>Rendimiento<sup>a</sup></b> <b>(%)</b>	<b>Hid. de</b> <b>carbono</b> <b>(% anh)</b>	<b>Proteínas</b> <b>solubles</b> <b>(%)</b>	<b>Ac. Urónicos</b> <b>(%)</b>	<b>Sulfato</b> <b>(% SO<sub>3</sub>Na)</b>	<b>Peso</b> <b>molecular</b> <b>(KDa)</b>
<b>EOH<sub>1</sub></b>	22,7	15	9	6	2	n.d
<b>EOH<sub>2</sub></b>	16,2	4	2	2	2	n.d.
<b>EAR</b>	2,2	48	6	21	15	6,5
<b>EAH1</b>	2,0	52	3	32	11	6,0
<b>EAH2</b>	2,0	54	3	38	9	6,1
<b>EAH3</b>	1,4	55	4	45	7	7,3
<b>EAH4</b>	0,7	55	9	51	5	5,6
<b>EAH5</b>	0,3	60	9	50	8	3,7
<b>EAH6</b>	0,2	53	8	49	7	3,2
<b>EAH7</b>	0,2	56	12	47	8	3,7
<b>EAH8</b>	0,2	48	12	37	8	2,6
<b>EAH9</b>	0,2	28	17	36	7	1,2

<sup>a</sup> Calculado a partir del peso seco del alga.

**TABLA 4.2. Composición de monosacáridos de los extractos de *D. dichotoma* proveniente de los extractos hidroalcohólicos y acídicos.**

Azúcares	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man-OH	Man	Gal	Glc
EOH <sub>1</sub>	-	-	-	-	100	-	-	-
EOH <sub>2</sub>	-	-	-	-	100	-	-	-
EAR	2	36	1	18	-	14	23	6
EAH1	2	42	2	29	-	16	8	1
EAH2	2	28	2	30	-	29	7	2
EAH3	2	18	4	35	-	35	5	3
EAH4	2	12	2	25	-	51	5	3
EAH5	2	9	1	23	-	55	5	5
EAH6	2	20	-	16	-	50	8	4
EAH7	2	15	2	15	-	49	9	8
EAH8	2	20	2	17	-	41	11	7
EAH9	1	19	2	11	-	44	9	14

El fucoidano extraído EAR se obtuvo con un rendimiento del 2,2%, presentando altas cantidades de hidratos de carbono (48%) y ácidos urónicos (21%), cantidades menores de grupos sulfato (15%), proteínas (6%) y bajo peso molecular (6,5 KDa). La fucosa fue el principal monosacárido encontrado, pero además se detectaron proporciones importantes de galactosa (23%), xilosa (18%), manosa (14%) y menores de glucosa (6%).

Seguidamente a la extracción con ácido clorhídrico a temperatura ambiente, se realizó una segunda extracción con el mismo solvente a 70 °C (EAH1), en la cual se obtuvo un rendimiento muy parecido al anterior (2%), y cuyas características analíticas indicaron

una gran cantidad de ácidos urónicos, menor proporción de grupos sulfato y proteínas, y un peso molecular similar al obtenido en EAR (Tabla 4.1). En estas condiciones, la fucosa continuó siendo el principal monosacárido, pero la cantidad de xilosa se incrementó a expensas de la galactosa (Tabla 4.2). El residuo fue secuencialmente reextraído con el mismo solvente hasta encontrar cantidades insignificantes de hidratos de carbono en el sobrenadante. Esta modalidad de extracción nos permitió aislar 8 extractos más (EAH2-EAH9), con un descenso del rendimiento gradual desde un 2% hasta un 0,2%. La proporción de hidratos de carbono fue similar en todos los extractos (48-60%), con excepción de EAH9, en el cual la cantidad encontrada fue menor (28%).

Las proporciones de ácidos urónicos se incrementaron en las sucesivas extracciones desde un 32% en EAH1 hasta un 50% en EAH4-EAH5, para luego disminuir hasta un 36% en EAH9. Con respecto a los grupos sulfatos, los extractos EAR y EAH1 fueron los que presentaron mayores proporciones (15% y 11%, respectivamente), mientras que en los demás sólo se observaron pequeñas variaciones (7-9%), a excepción de EAH4, cuya proporción de grupos sulfato fue aún más baja (5%). La cantidad de proteínas encontradas fue del 3% en los primeros extractos (EAH1 y EAH2), pero conforme las extracciones continuaron (EAH3-EAH6), se incrementaron desde 4% hasta 8% y, mientras los extractos EAH7 y EAH8 presentaron iguales proporciones de proteínas (12%), en EAH9 se detectó el porcentaje más alto (17%).

El peso molecular en EAH1 y EAH2 fue muy parecido (6 KDa). EAH3 tenía un peso molecular de 7,3 KDa, siendo el más alto y conforme las extracciones continuaron, los pesos moleculares disminuyeron desde 5,6 KDa para EAH4 hasta 1,2 KDa para EAH9.

Respecto de los azúcares componentes, EAH1 fue el extracto más rico en fucosa (42%), la xilosa siguió siendo un constituyente importante (29%), seguido de manosa (16%) y galactosa (8%) y además presentó cantidades ínfimas de glucosa, ramnosa y arabinosa ( $\leq 2\%$ ). Cabe señalar que en la secuencia extractiva la galactosa fue siempre un componente minoritario (5-11%) y la glucosa de EAH1 al EAH6 presentó proporciones bajas (1-5%), mientras que en las últimas extracciones (EAH7-EAH9), comenzó a ser un

componente más importante (8-14%); la ramnosa y la arabinosa en todos los extractos presentaron cantidades ínfimas.

En EAH2, la proporción de manosa se incrementó y la cantidad de fucosa disminuyó, aunque se observaron proporciones muy similares de manosa, fucosa y xilosa (cerca del 30%). En los siguientes extractos (EAH3 y EAH4) la cantidad de fucosa y xilosa continuaron disminuyendo hasta un 12% y un 25%, respectivamente, mientras aumentaba la proporción de manosa, que alcanzó una proporción del 51%.

En EAH5, la fucosa presentó la más baja proporción de toda la secuencia extractiva (9%), además la xilosa siguió disminuyendo (23%), mientras que la manosa alcanzó la más alta proporción (55%).

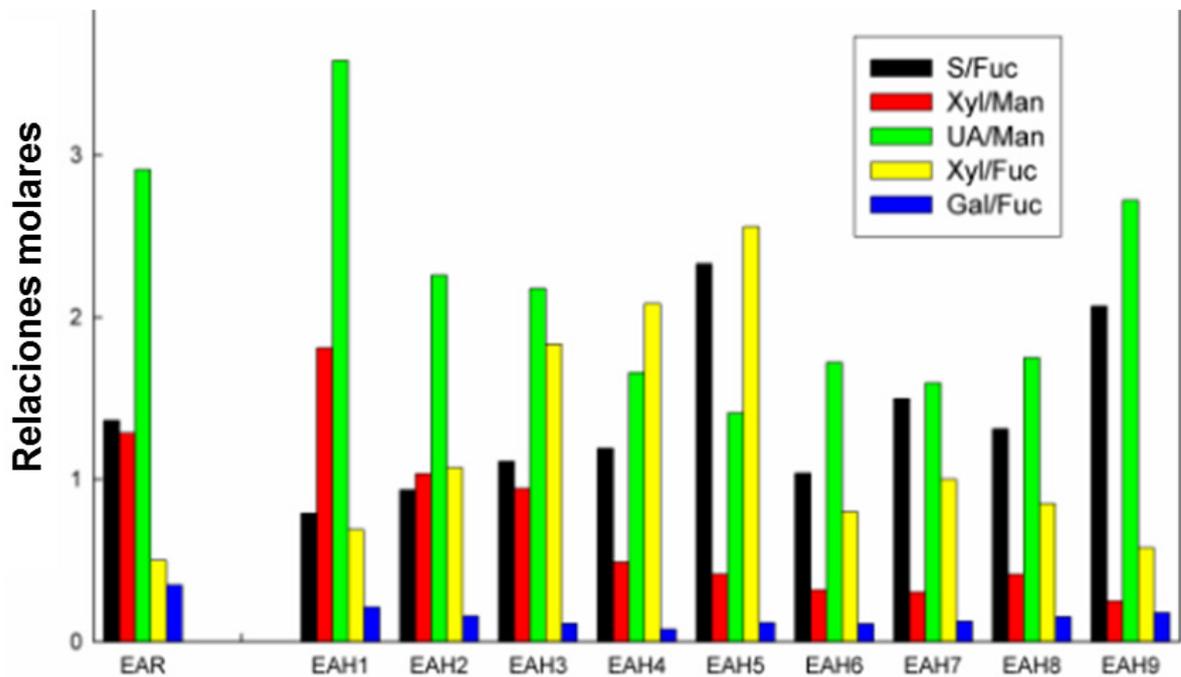
En los extractos EAH6 y EAH7, la cantidad de fucosa volvió a aumentar, presentando un 20% y 15%, respectivamente, mientras que la cantidad de xilosa disminuyó a un 15% y la manosa siguió manteniendo una alta proporción (50%). En tanto, la glucosa y la galactosa aumentaron ligeramente hasta alcanzar un valor del 9%.

En los dos últimos extractos (EAH8 y EAH9) siguió incrementándose esta tendencia de las proporciones de azúcares, donde la fucosa, xilosa y manosa disminuyeron, mientras que la galactosa y la glucosa ganaron preponderancia hasta alcanzar valores de 11% y 14%, respectivamente.

Tomados en conjunto, estos resultados nos sugieren que la mayor cantidad de galactofucanos y fucanos presentes en el alga parda *Dictyota dichotoma* fueron extraídos a temperatura ambiente (EAR), aunque siguieron siendo importantes en la primera extracción con ácido a 70 °C (EAH1). Los componentes extraídos en las extracciones ácidas a 70 °C, que fueron ricas en ácidos urónicos, manosa, xilosa, con menores proporciones de fucosa y grupos sulfato, sugirieron una estructura diferente.

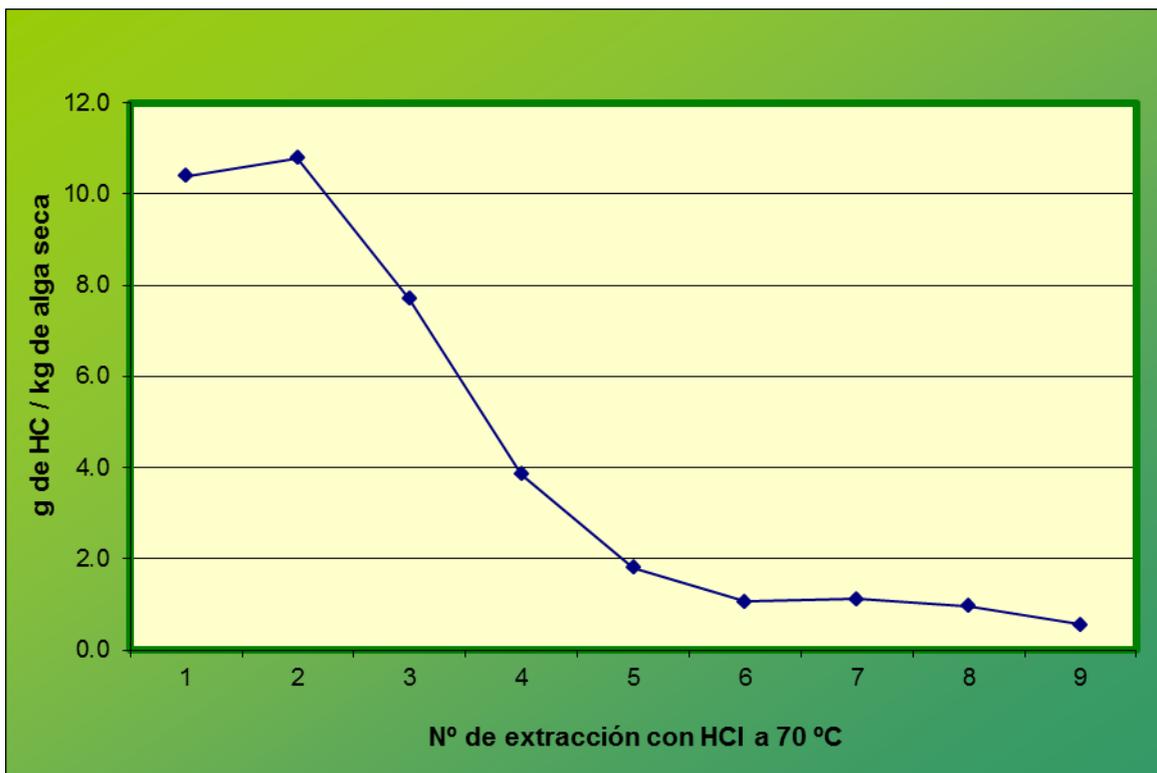
Esto fue demostrado en un análisis de las diversas relaciones molares entre los grupos sulfato (S), ácidos urónicos (UA) y azúcares componentes de los extractos (S/Fuc; Xil/Man; UA/Man; Xil/Fuc y Gal/ Fuc), los cuales se evidencian en la Figura 4.1. Las relaciones Gal/Fuc en todos los extractos fueron más o menos constantes, así como las

relaciones sulfato/fucosa en la mayoría de las fracciones, con excepción de EAH5 y EAH9, sugiriendo que los galactofucanos sulfatados son también un constituyente de esos polisacáridos. Los análisis de las relaciones Xil/Fuc y Xil/Man sugirieron que la xilosa probablemente aparece sustituyendo tanto a los manoglucuronanos como a los galactofucanos.



**Figura 4.1. Proporciones molares de los diferentes extractos del alga parda *D. dichotoma*.**

La Figura 4.2 mostró como el rendimiento de hidratos de carbono en g/kg de alga seca disminuyó notablemente conforme continuó la extracción ácida a 70 °C. En los primeros cinco extractos (EAH1-EAH5) dicha relación disminuyó de 10,4 hasta 1,8 mientras en los tres siguientes (EAH6-EAH8), el rendimiento siguió disminuyendo hasta un valor aproximadamente de 1,0 y en el EAH9 la cantidad es sumamente pequeña (0,6 g HC/Kg de alga seca). Esto nos mostró que con la extracción a temperatura ambiente y hasta la cuarta extracción a 70 °C se agotó la mayor parte del material polisacárido de la feofita *Dictyota dichotoma*, siendo cinco extracciones las óptimas para extraer al fucoidano de dicha feofita.



**Figura 4.2. Análisis del rendimiento de hidratos de carbono (g/kg del alga seca) en las nueve extracciones exhaustivas con HCl (pH 2) a 70 °C.**

Con la finalidad de corroborar que la extracción ácida no había degradado al fucoidano, se decidió hacer una extracción a partir de 50 g del alga, primero con etanol acuoso al 80% a temperatura ambiente, y luego a 70 °C. Seguidamente, tras centrifugación, al residuo se le agregó agua durante 7 h a temperatura ambiente con agitación mecánica. Igual que en el extracto anterior, se hicieron los análisis colorimétricos, y la derivatización a alditoles peracetilados tras hidrolisis con TFA 2M (Tabla 4.3 y 4.4).

Con respecto a los extractos hidroalcohólicos, al igual que en aquellos obtenidos con ácido diluido y como era de esperar, se observó un rendimiento del 35,8% del peso seco, siendo el único componente encontrado el manitol.

**Tabla 4.3. Comparación de los análisis generales de los extractos del alga *D. dichotoma* provenientes de los extractos ácido (EAR) y acuoso (EW).**

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Proteínas solubles (%)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
<b>EAR</b>	2,2	48	6	21	15	6,5
<b>EW</b>	2,6	51	1	19	10	3,3

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del alga.

**Tabla 4.4. Composición de monosacáridos de los extractos de *D. dichotoma* provenientes del extracto ácido (EAR) y acuoso (EW).**

Azúcares componentes	Ram	Fuc	Ara	Xil	Man	Gal	Glc
<b>EAR</b>	2	36	1	18	14	23	6
<b>EW</b>	4	31	13	17	12	8	14

Tanto en los análisis químicos generales de los extractos acuosos como ácidos a temperatura ambiente, se pudo observar una gran similitud en la alta cantidad de hidratos de carbono (51% y 48%), así como también en la cantidad de ácidos urónicos (19% y 21%), respectivamente. Por otro lado, el peso molecular y la cantidad de grupos sulfato en los extractos ácidos (6,5 KDa, 15%) fueron mayores que en los extractos acuosos (3,3 KDa, 10%).

Con respecto a los azúcares componentes la cantidad de fucosa, xilosa y manosa del extracto acuoso y ácido a temperatura ambiente fueron muy similares; sin embargo, la cantidad de galactosa disminuyó a un 8%, a expensas de un incremento en la cantidad de glucosa alcanzando un 14% y arabinosa, 13%. Cabe señalar que este incremento en la cantidad de glucosa del extracto acuoso nos sugeriría que en el

extracto acuoso probablemente hubo una coextracción del fucoidano con el laminarano.

Todos estos análisis colorimétricos y de azúcares componentes de los extractos acuosos nos mostraron que el fucoidano extraído del extracto ácido no se degradó.

### **4.3. Extracción del alginato de sodio**

La extracción del alginato de sodio se realizó con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 3% por tres veces consecutivas. En un paso posterior, se procedió a purificar el alginato de sodio (ver Capítulo 7), para finalmente analizarlo por resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  y por métodos químicos. La primera técnica química es la reducción descrita por Taylor y Conrad<sup>1</sup> en la cual previamente a la reducción con borodeuterio de sodio, los grupos ácidos son activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y el segundo método fue el denominado “metanol mágico” descrito por Usov y colaboradores<sup>2</sup>, en el cual la reducción de ácidos urónicos se lleva a cabo agregándole una mezcla de metanol, cloroformo y ácido clorhídrico concentrado (10:1:1,2), con posterior agregado de borohidruro de sodio, y finalmente se hidrolizan los polisacáridos reducidos con TFA 2M y derivatización a alditoles peracetilados.

Los análisis generales mostraron que el polisacárido tuvo un alto rendimiento (41,7%) y alta proporción de ácidos urónicos (40,1%). Su peso molecular fue de 4,1 KDa.

La composición de los ácidos urónicos del alginato de sodio de *Dictyota dichotoma* (Tabla 4.5) obtenida tanto por métodos químicos, metanol mágico (MM) y con EDC, como por métodos espectroscópicos RMN- $^{13}\text{C}$  siempre mostraron una preponderancia del ácido manurónico sobre el ácido gulurónico.

Tabla 4.5. Composición de ácidos urónicos del alginato de sodio.

Composición del NaAlg	MM (%)	EDC (%)	RMN- <sup>13</sup> C (%)
Manosa	58,6	62,9	76,9
Gulosa	41,4	37,1	23,1

Además, los desplazamientos químicos del análisis por RMN de <sup>13</sup>C (Figura 4.3 y Tabla 4.6), fueron comparados con aquellos presentados por Heyraud y colaboradores<sup>3</sup> indicando que la composición de alginato estaba constituida por triadas con mayor proporción de MMM que de GGG.

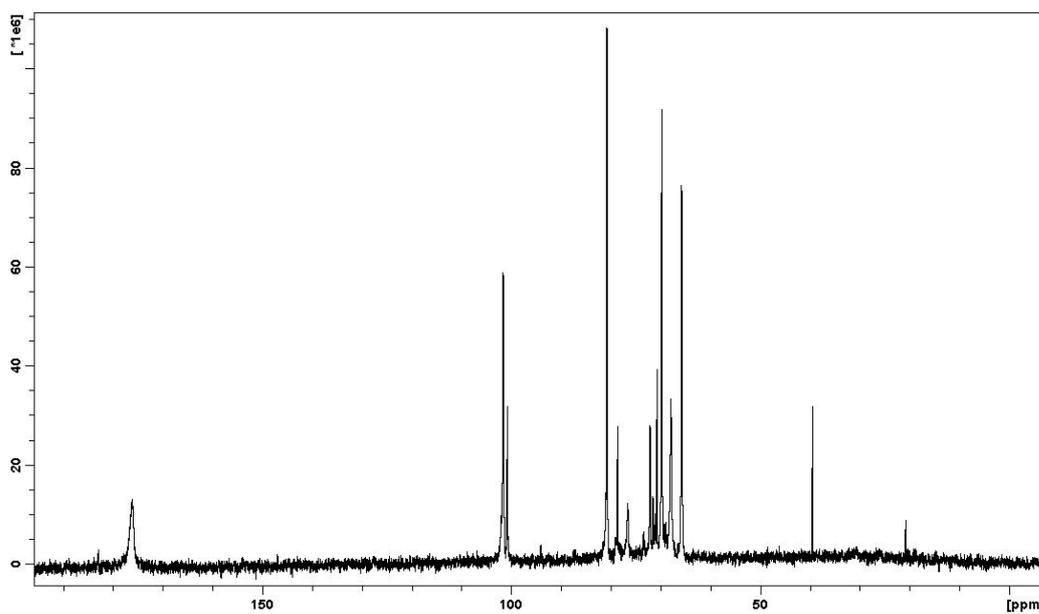


Figura 4.3 Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>13</sup>C) del alginato de sodio a 500 MHz.

**Tabla 4.6. Desplazamiento químico de RMN-<sup>13</sup>C del alginato de sodio.**

	<b>C-1</b>	<b>C-2</b>	<b>C-3</b>	<b>C-4</b>	<b>C-5</b>
<b>GGG</b>	101,03	71,59	72,63	79,34	76,96
<b>MMM</b>	101,94	66,38	70,39	81,15	68,43

#### **4.4. Fraccionamiento de los fucoidanos provenientes de los extractos acídicos**

Como hemos mencionado en el Capítulo 1, las extracciones y la purificación de los polisacáridos se llevaron a cabo con la finalidad de conseguir un material tan homogéneo como sea posible, con un alto rendimiento y sin degradación.

Existen varias formas de realizar fraccionamientos, los métodos de precipitación selectiva con un detergente catiónico o con concentraciones crecientes de solventes son adecuados para cantidades grandes de material de partida (1 g o más), mientras que las separaciones cromatográficas pueden llevarse a cabo a niveles de miligramos.

El fraccionamiento de los extractos acídicos tanto a temperatura ambiente como a 70 °C, se llevó a cabo con la técnica de precipitación con cetrimide (Figura 4.4).

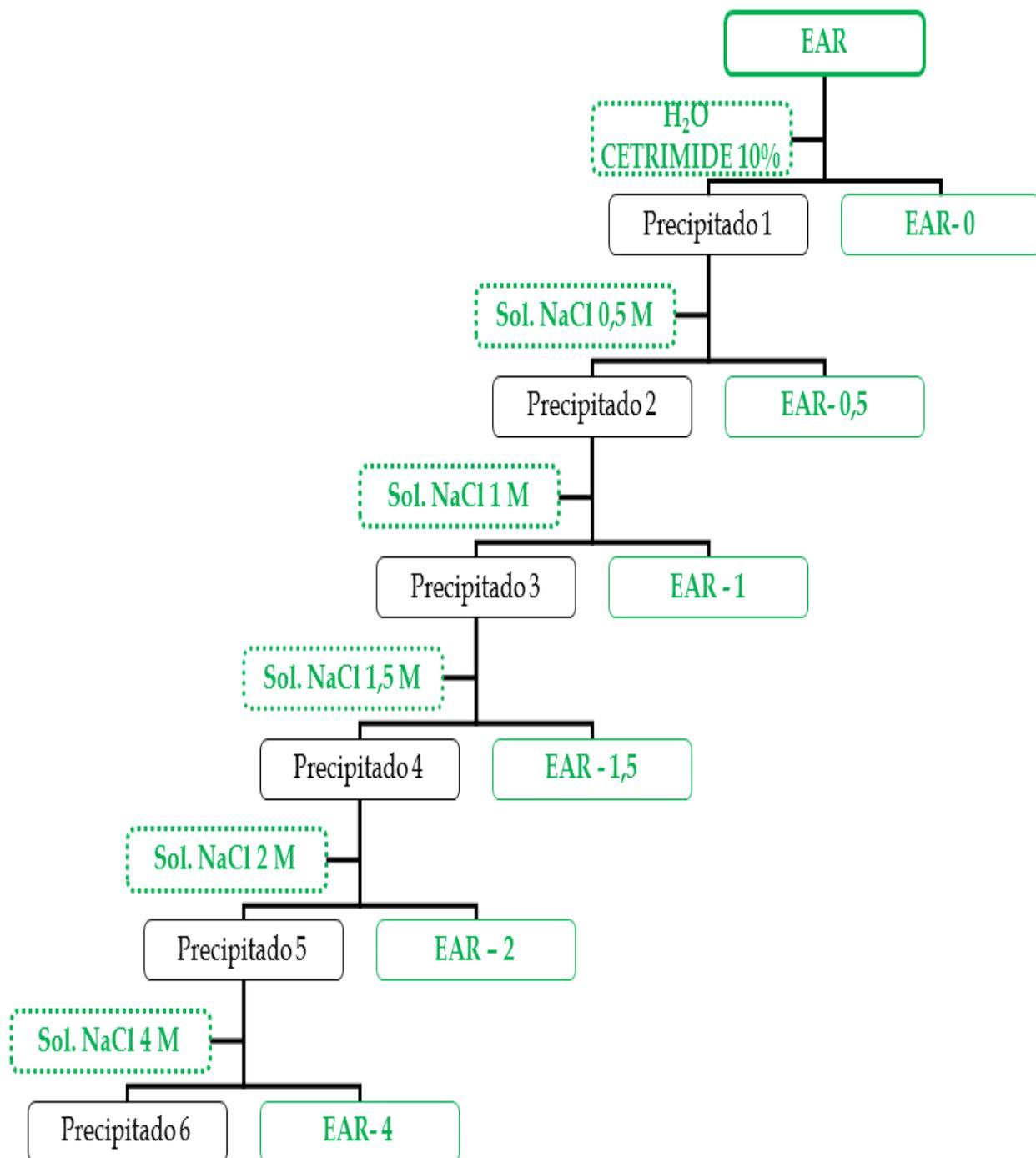


Figura 4.4. Esquema de precipitación con cetrime y posterior redisolución con concentraciones crecientes de NaCl.

Como se detalla en el Capítulo 7, a una solución de EAR, se le agregó cetrimide al 10% muy lentamente y con agitación magnética, hasta corroborar que no se forma más complejo precipitado (aproximadamente entre 6-8 mL). La mezcla permaneció una noche en agitación y tras centrifugar, se obtuvo una fracción soluble (-0), mientras que las sales insolubles fueron secuencialmente redisueltas con concentraciones crecientes de NaCl de 0,5; 1; 1,5; 2; 4; y en algunos casos 5 M. Dicho procedimiento también se llevó a cabo para todos los extractos obtenidos a 70 °C (EAH1-EAH9).

#### **4.4.1. Análisis de las subfracciones de EAR**

Los datos obtenidos de EAR fueron interpretados como un sistema sumamente complejo, heterodisperso, en función de varias variables: cantidad de hidratos de carbono, ácidos urónicos, grupos sulfato, peso molecular y azúcares constituyentes (Tablas 4.8 y 4.9).

El fraccionamiento mostró cinco productos diferentes (EAR-0,5-EAR-4) en proporciones variables (desde 5,5% hasta 10,6%) y una fracción EAR-5 en proporciones ínfimas (0,8%), en la cual solo se pudieron determinar los azúcares componentes.

EAR-0 permaneció soluble en presencia del detergente catiónico y se presentó sólo en pequeña proporción (4,1%). Sorprendentemente esta fracción presentó cantidades significativas de grupos aniónicos (especialmente sulfato, 11%), cantidades altas de hidratos de carbono (40%), proporciones pequeñas de ácidos urónicos (5%) y bajo peso molecular (1,5 KDa). En esta fracción la glucosa fue el principal monosacárido (38%), pero la fucosa, xilosa, manosa y ramnosa aparecieron en cantidades significativas, y la arabinosa y galactosa en proporciones pequeñas (5%). Esta alta cantidad de glucosa probablemente provenga de la coextracción del laminarano. Además, la presencia de polisacáridos sulfatados no precipitados con cetrimide podría deberse a la existencia de un catión divalente como el calcio o un agente complejante que inhibiría a los grupos aniónicos interaccionar con el detergente catiónico (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7. Análisis de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y redisolución con NaCl provenientes del EAR de *D. dichotoma*.**

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
<b>EAR-0</b>	4,1	40	5	11	1,5
<b>EAR-0,5</b>	10,6	63	40	13	8,4
<b>EAR-1</b>	5,5	67	24	24	11,5
<b>EAR-1,5</b>	7,5	59	16	30	16,3
<b>EAR-2</b>	8,8	59	14	33	23,6
<b>EAR-4</b>	8,5	59	4	34	26,3
<b>EAR-5</b>	0,8	n.d	n.d	n.d	n.d

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del alga.

Los análisis de las fracciones obtenidas por redisolución de los precipitados con cetrimide (EAR-0,5-EAR-5) indicaron que hubo una relación directa entre los porcentajes de los grupos sulfato y peso molecular e inversa con la concentración de ácidos urónicos conforme se incrementaron las concentraciones de cloruro de sodio necesarias para solubilizar las fracciones, pero la composición de los monosacáridos también mostró tendencias directas con respecto a la concentración de la solución: la galactosa tuvo tendencia a incrementar con la concentración de NaCl, mientras que la xilosa y manosa tendieron a disminuir (Tabla 4.8).

**Tabla 4.8. Composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y redisolución con NaCl provenientes de la fracción EAR de *D. dichotoma* (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAR-0</b>	10	16	5	13	13	5	38
<b>EAR-0,5</b>	2	40	2	30	16	6	4
<b>EAR-1</b>	1	41	-	27	16	13	2
<b>EAR-1,5</b>	1	46	-	23	18	10	2
<b>EAR-2</b>	1	43	-	16	10	28	2
<b>EAR-4</b>	1	37	1	8	1	51	1
<b>EAR-5</b>	3	38	2	7	4	43	3

En el fraccionamiento de este producto se obtuvieron dos fracciones principales con características diferentes: una fracción redisuelta con 0,5 M de NaCl (10,6%), con proporciones altas no solo de ácidos urónicos sino también de grupos sulfato; esta fracción presentó una heterogeneidad significativa con respecto a los monosacáridos (Fuc, Xil, Man y Gal); mientras que otra fracción, redisuelta en 2 M de NaCl (8,8%), presentó características de un galactofucano sulfatado, es decir proporciones más altas de galactosa (28%) y fucosa (43%).

Con la finalidad de buscar posibles mezclas de polisacáridos en la fracción EAR-0, se decidió hacer una cromatografía por permeación en geles usando una columna de Biogel P-30 eluida con NaCl 0,1 M a escala preparativa (Figura 4.5), obteniéndose tres fracciones (EAR-0A, EAR-0B y EAR-0C), cuyos análisis generales se observan en las tablas 4.9 y 4.10.

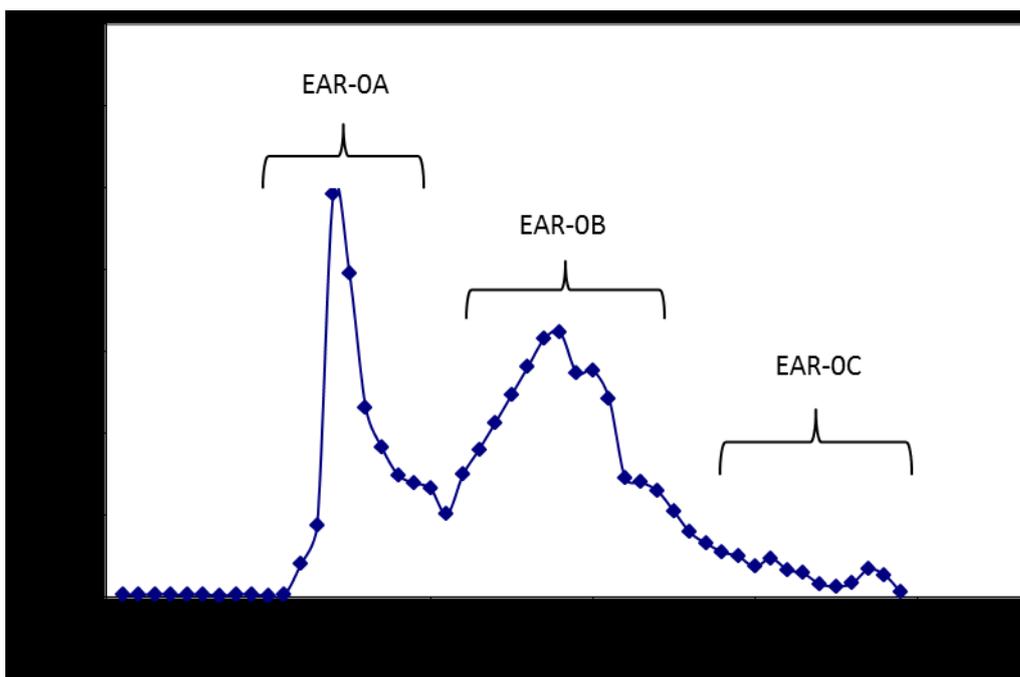


Figura 4.5. Cromatografía por permeación en geles en una columna de Biogel P-30 de la fracción EAR-0 a escala preparativa.

Tabla 4.9. Análisis de las fracciones obtenidas fracciones obtenidas por cromatografía por permeación en geles en una columna de Biogel P-30, de la fracción EAR-0 a escala preparativa.

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
EAR-OA	15	47	4	8	2,4
EAR-OB	19	57	5	9	1,0
EAR-OC	13	16	2	15	1,1

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso de EAR-0.

**Tabla 4.10. Composición monosacáridica de las fracciones obtenidas por cromatografía por permeación en geles en una columna de Biogel P-30, de la fracción EAR-0 a escala preparativa (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAR-0A</b>	7	9	10	30	11	15	19
<b>EAR-0B</b>	3	5	5	13	11	3	62
<b>EAR-0C</b>	4	17	4	22	18	8	27

Como se puede apreciar en los resultados del fraccionamiento del EAR-0, la heterogeneidad persistió en las tres fracciones. Los análisis generales mostraron altas cantidades de hidratos de carbono, excepto la fracción EAR-0C, que tan solo contenía un 16%. Además, la cantidad de ácidos urónicos y el peso molecular fueron muy bajos ( $\leq 5$  y  $\leq 2,4$  KDa, respectivamente).

Con respecto a los azúcares componentes, se observó que la subfracción EAR-0A siguió siendo heterodispersa con respecto a sus azúcares, predominado la Xil (30%), seguida de Gal (15%) y casi iguales cantidades de Fuc, Ara y Man (11%), mientras que la subfracción EAR-0B, mostró características de un laminarano, es decir altas cantidades de glucosa (62%), acompañada de proporciones menores de xilosa y manosa. El último pico (EAR-0C) mostró características de un fucoidano sulfatado, acompañado de proporciones significativas de xilosa, manosa y glucosa.

Asimismo, con la finalidad de estudiar la homogeneidad del polisacárido, se decidió hacer este mismo fraccionamiento con las restantes fracciones (EAR-0,5 hasta EAR-4). Todas las fracciones mostraron un solo pico (Fig. 4.6) mostrándonos que todas son polidispersas con respecto al peso molecular, si en caso hubieran dos polisacáridos diferentes estos tendrían similares pesos moleculares.

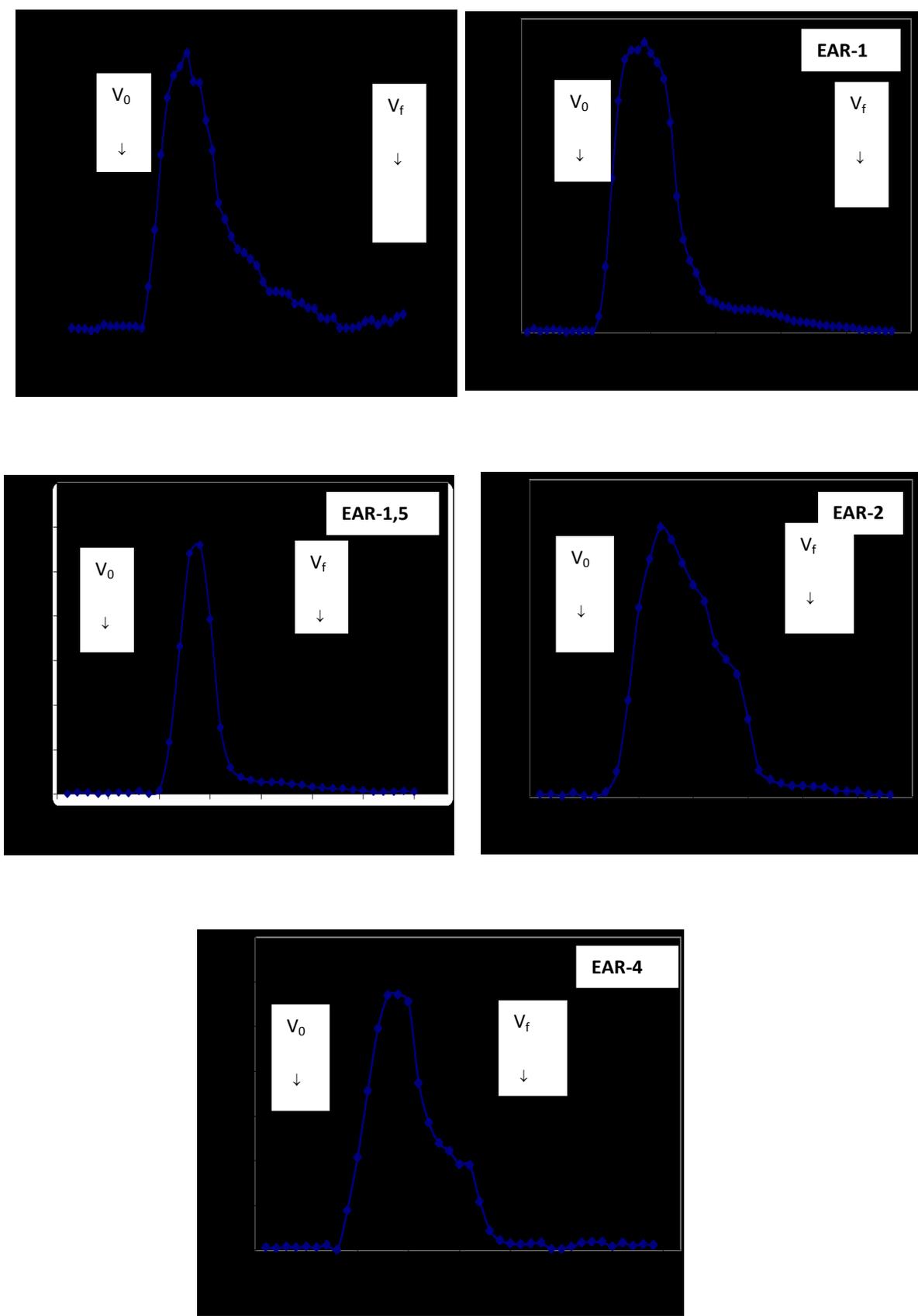


Figura 4.6. Cromatografía por permeación en geles en una columna de Biogel P-30 de las fracciones (EAR-0,5-EAR-4) a escala analítica.

#### 4.4.2. Análisis de las fracciones del extracto ácido a 70 °C (EAH)

Como se mencionó anteriormente, la purificación de todos los extractos ácidos a 70 °C se llevaron a cabo precipitándolos con cetrimide al 10% y posterior redisolución con concentraciones crecientes de NaCl (0,5; 1; 1,5; 2; 4 y en algunos casos 5 M).

En todas las fracciones obtenidas, se determinaron las proporciones de los hidratos de carbono, ácidos urónicos, sulfato, peso molecular y los azúcares componentes.

**Tabla 4.11. Análisis generales de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH1.**

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
<b>EAH1-0</b>	1,0	62	21	11	2,6
<b>EAH1-0,5</b>	17,7	50	51	6	5,1
<b>EAH1-1</b>	14,6	63	36	14	14,8
<b>EAH1-1,5</b>	17,1	64	30	19	13,7
<b>EAH1-2</b>	3,9	44	12	21	18,2
<b>EAH1-4</b>	2,1	35	3	21	18,3
<b>EAH1-5</b>	0,4	n.d	n.d	n.d	n.d

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del EAR.

**Tabla 4.12. Composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH1.**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH1-0</b>	5	22	1	17	6	13	36
<b>EAH1-0,5</b>	2	22	1	45	27	2	1
<b>EAH1-1</b>	1	47	-	23	22	6	1
<b>EAH1-1,5</b>	2	41	-	26	25	5	1
<b>EAH1-2</b>	3	30	1	15	9	40	2
<b>EAH1-4</b>	4	27	1	8	4	49	7
<b>EAH1-5</b>	4	16	3	26	18	25	8

Como se puede apreciar en las tablas 4.11 y 4.12, el fraccionamiento de EAH1 mostró que la fracción soluble tuvo un rendimiento ínfimo (1%, EAH1-0). Además, se observó que hay tres fracciones principales redisueltas con NaCl 0,5; 1 y 1,5 M, cuyos rendimientos fueron del 17,7%, 14,6% y 17,1%, respectivamente. Los análisis generales mostraron que hubo un incremento en la cantidad de grupos sulfato y peso molecular y una disminución en la cantidad de ácidos urónicos conforme avanzó la redisolución con NaCl. Estas fracciones se caracterizan por la presencia de fucosa, xilosa y manosa. De manera general, la fracción EAH1-0,5 presentó una relación Fuc:Xil:Man de 1:2:1; en cambio, las otras dos fracciones mostraron una relación de 2:1:1. En las tres fracciones la galactosa se encontró en proporciones muy pequeñas ( $\leq 6\%$ ). Por otro lado, las fracciones EAH1 redisueltas en 2, 4 y 5 M de NaCl, a pesar de ser las fracciones minoritarias, mostraron un incremento en la proporción de galactosa, donde dicho monosacárido viene a ser el principal, seguido de la fucosa.

**Tabla 4.13. Análisis generales de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH2 y EAH3.**

	<b>Rendimiento<sup>a</sup></b> <b>(%)</b>	<b>Hid. de</b> <b>carbono</b> <b>(% anh)</b>	<b>Ac. Urónicos</b> <b>(%)</b>	<b>Sulfato</b> <b>(% SO<sub>3</sub>Na)</b>	<b>Peso</b> <b>molecular</b> <b>(KDa)</b>
<b>EAH2-0</b>	6,4	58	26	9	3,5
<b>EAH2-0,5</b>	31,9	80	42	10	9,0
<b>EAH2-1</b>	12,3	59	25	18	8,5
<b>EAH2-1,5</b>	4,3	64	24	23	16,2
<b>EAH2-2</b>	0,9	22	4	32	16,7
<b>EAH2-4</b>	0,5	57	2	19	16,8
<b>EAH2-5</b>	0,8	66	2	24	n.d.
<b>EAH3-0</b>	6,7	57	43	5	3,7
<b>EAH3-0,5</b>	24,9	62	48	7	6,4
<b>EAH3-1</b>	10,0	66	38	12	8,2
<b>EAH3-1,5</b>	0,5	52	3	15	9,3
<b>EAH3-2</b>	0,6	40	3	22	7,6
<b>EAH3-4</b>	1,0	30	2	22	17,6
<b>EAH3-5</b>	0,5	n.d	n.d	27	n.d

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del EAH1, EAH2 para los extractos del EAH2 y EAH3, respectivamente.

**Tabla 4.14. Composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH2 y EAH3.**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH2-0</b>	5	18	2	20	23	12	20
<b>EAH2-0,5</b>	1	26	-	36	33	4	-
<b>EAH2-1</b>	1	22	3	36	29	5	4
<b>EAH2-1,5</b>	2	37	-	26	24	8	3
<b>EAH2-2</b>	5	32	-	21	11	27	4
<b>EAH2-4</b>	4	9	-	12	6	2	67
<b>EAH2-5</b>	2	9	4	39	23	15	8
<b>EAH3-0</b>	6	11	2	21	33	15	12
<b>EAH3-0,5</b>	1	12	-	41	41	2	3
<b>EAH3-1</b>	1	24	-	31	35	6	3
<b>EAH3-1,5</b>	3	18	-	16	31	10	22
<b>EAH3-2</b>	4	8	3	23	29	24	9
<b>EAH3-4</b>	2	3	4	47	18	8	18
<b>EAH3-5</b>	5	2	-	40	28	4	21

El fraccionamiento con cetrimide de EAH2 y EAH3 dio lugar a dos subfracciones consecutivas importantes (Tablas 4.13 y 4.14). Una de ellas es la fracción redisuelta en 0,5 M de NaCl, que se obtuvo con alto rendimiento (25-32%), rica en hidratos de carbono (62-80%), ácidos urónicos (42-48%), con proporciones bajas de grupos sulfato (7-10%). En la fracción EAH1-0,5, la xilosa fue el azúcar principal, seguido de la manosa y fucosa; mientras que en la fracción EAH2-0,5, la xilosa y manosa ganaron preponderancia a expensas de la fucosa.

La otra fracción destacable es la redisuelta en 1 M de NaCl (10-12%). Aunque sigue conteniendo cantidades significativas de ácidos urónicos, la proporción de xilosa y manosa disminuyó un poco a expensas de la fucosa que ganó preponderancia alcanzando proporciones de 22-24%. Las fracciones restantes son menos importantes, presentando un descenso importante en la cantidad de ácidos urónicos, y un incremento en la cantidad de grupos sulfato y peso molecular conforme la redisolución prosigue. El análisis de azúcares componentes mostró que la xilosa fue el principal monosacárido, seguido de la manosa y fucosa (Tabla 4.14). Cabe señalar que en todas las fracciones se encontraron cantidades muy altas de hidratos de carbono (40-80%), excepto para las fracciones EAH2-2 y EAH3-4 cuyas proporciones fueron de 22% y 30%, respectivamente.

El fraccionamiento de EAH4, EAH5 y EAH6 (Tablas 4.15 y 4.16) sólo mostró una fracción importante, redisuelta en 0,5 M NaCl, cuyos rendimientos fueron del 47,2%, 30,4% y 25,3%, respectivamente. Estas fracciones siempre contienen cantidades importantes de hidratos de carbono (58-73%) y ácidos urónicos (42-50%), están apenas sulfatadas (5-6%) y tienen bajo peso molecular (7,5-8,4 KDa). Ellas se caracterizaron por presentar un contenido muy alto de manosa (51-64%), seguido de xilosa (15-30%), y además, se ha encontrado cantidades pequeñas de fucosa (6-10%) y galactosa (5%).

**Tabla 4.15. Análisis generales de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH4-EAH6.**

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
<b>EAH4-0</b>	2,6	53	18	4	2,1
<b>EAH4-0,5</b>	47,2	68	48	5	8,0
<b>EAH4-1</b>	0,8	n.d	n.d	n.d	3,5
<b>EAH4-1,5</b>	0,4	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH4-2</b>	0,7	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH4-4</b>	1,6	30	2	17	6,2
<b>EAH5-0</b>	5,8	58	42	3	3,5
<b>EAH5-0,5</b>	30,4	73	50	5	8,4
<b>EAH5-1</b>	0,5	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH5-2</b>	0,5	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH6 -0</b>	5,8	26	24	20	2,9
<b>EAH6-0,5</b>	25,3	58	42	6	7,5
<b>EAH6-1</b>	4,1	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH6-1,5</b>	3,8	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH6-2</b>	2,4	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH6-4</b>	0,8	26	2	n.d	15,1

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del EAH3, EAH4 y EAH5 para los extractos del EAH4, EAH5 y EAH6, respectivamente.

**Tabla 4.16. Composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH4-EAH6 (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH4-0</b>	6	9	1	8	27	18	31
<b>EAH4-0,5</b>	1	10	-	30	51	5	3
<b>EAH4-1</b>	8	11	-	8	46	7	20
<b>EAH4-1,5</b>	1	1	2	55	33	3	5
<b>EAH4-2</b>	7	2	11	23	35	5	17
<b>EAH4-4</b>	2	32	4	19	26	13	16
<b>EAH5-0</b>	3	7	2	12	42	12	22
<b>EAH5-0,5</b>	2	7	1	15	64	5	6
<b>EAH5-1</b>	7	6	-	21	30	11	25
<b>EAH5-2</b>	2	5	-	17	31	13	32
<b>EAH5-4</b>	8	5	-	27	21	9	30
<b>EAH6-0</b>	4	25	1	18	30	14	8
<b>EAH6-0,5</b>	1	6	-	21	62	5	5
<b>EAH6-1</b>	7	5	3	15	29	10	31
<b>EAH6-1,5</b>	9	14	8	19	21	8	22
<b>EAH6-2</b>	1	3	3	20	38	8	27
<b>EAH6-4</b>	-	2	1	10	17	4	66

En el fraccionamiento de EAH7, EAH8 y EAH9, la fracción redisuelta en 0,5 M NaCl fue la más importante de las precipitadas con cetrimide, con rendimientos del 39,8%, 15,7% y 15,8%, respectivamente (Tabla 4.17). La fracción soluble en cetrimide comenzó a tomar importancia conforme avanzó la extracción secuencial, siendo sus proporciones menores en EAH7, equivalentes en EAH8 y mucho más grandes en EAH9.

La fracción redisuelta en 0,5 M NaCl (Tabla 4.18) mostró las mismas características que aquellas encontradas previamente: cantidades altas de ácidos urónicos mezclados o combinados con xilomananos.

Por otro lado, las fracciones -0, mostraron una gran heterogeneidad: aunque los laminaranos posiblemente estén presentes, otros polisacáridos conteniendo los otros monosacáridos remanentes (especialmente xilosa y manosa) también existen. Además, dichas fracciones mostraron cantidades significativas de grupos aniónicos como ácidos urónicos (10-45%) y grupos sulfato (9-30%), sugiriendo un polisacárido similar a aquellos encontrados en las fracciones redisueltas en -0,5, los cuales por algún motivo no pudieron interactuar con el detergente catiónico.

Cabe señalar que aunque en las fracciones EAH7-1, EAH7-1,5 y EAH7-2 el rendimiento fue pequeño ( $\leq 3\%$ ), la arabinosa, que es un monosacárido inusual en las algas pardas, aparece en cantidades significativas (16-20%, Tabla 4.18). Además, estas fracciones mostraron características compatibles con la presencia de xilomananos, lo cual no es habitual en las algas pardas.

#### **4.5. Ácidos urónicos**

Con la finalidad de conocer la identidad de los ácidos urónicos, a las fracciones provenientes del extracto EAR se aplicó la técnica de Taylor y Conrad<sup>1</sup>, en el cual los grupos ácidos son activados con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), para luego reducirlos con borodeuteriuro de sodio.

**Tabla 4.17. Análisis generales de las fracciones obtenidas por precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH7-EAH9.**

	Rendimiento <sup>a</sup> (%)	Hid. de carbono (% anh)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (% SO <sub>3</sub> Na)	Peso molecular (KDa)
<b>EAH7-0</b>	19,6	37	17	13	2,1
<b>EAH7-0,5</b>	39,8	61	35	9	3,5
<b>EAH7-1</b>	3,0	55	4	14	8,5
<b>EAH7-1,5</b>	1,6	49	1	15	15,1
<b>EAH7-2</b>	2,2	36	1	16	18,8
<b>EAH7-4</b>	13,3	9	1	20	n.d
<b>EAH8-0</b>	13,1	57	45	9	2,6
<b>EAH8-0,5</b>	15,7	64	42	9	4,9
<b>EAH8-1</b>	2,0	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH8-4</b>	3,1	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>EAH9-0</b>	38,3	23	10	30	2,1
<b>EAH9-0,5</b>	15,8	43	20	12	3,2
<b>EAH9-1</b>	2,4	48	2	12	n.d

<sup>a</sup> Calculado sobre el peso seco del EAH6, EAH7 y EAH8 para los extractos del EAH7, EAH8 y EAH9, respectivamente.

**Tabla 4.18. Composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes de EAH7-EAH9 (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH7-0</b>	3	13	11	15	27	8	23
<b>EAH7-0,5</b>	-	11	-	19	57	7	6
<b>EAH7-1</b>	4	6	20	34	15	7	14
<b>EAH7-1,5</b>	4	4	19	16	22	5	30
<b>EAH7-2</b>	4	3	16	19	33	8	17
<b>EAH7-4</b>	-	4	9	59	14	4	10
<b>EAH8-0</b>	3	9	2	18	53	7	8
<b>EAH8-0,5</b>	-	6	-	17	64	6	7
<b>EAH8-1</b>	1	9	2	26	48	5	9
<b>EAH8-4</b>	2	19	5	19	26	17	12
<b>EAH9-0</b>	1	21	5	17	29	10	17
<b>EAH9-0,5</b>	1	7	4	21	51	6	10
<b>EAH9-1</b>	2	5	13	44	9	5	22

La Tabla 4.19 mostró la comparación de los monosacáridos provenientes de las fracciones obtenidas de EAR y las reducidas con EDC, en la que se puede observar que la mayoría de las fracciones (EAR-1-EAR-4) no mostraron diferencias en cuanto a la composición de monosacáridos, más que aquellas contempladas en el error esperado. Solo la fracción EAR-0,5R, rica en ácidos urónicos, mostró un notable aumento en la proporción de manosa (43%).

**Tabla 4.19. Comparación de la composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl provenientes del EAR y las reducidas con EDC (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAR-0,5</b>	2	40	2	30	16	6	4
<b>EAR-0,5R</b>	2	13	7	27	43	4	5
<b>EAR-1</b>	1	41	-	27	16	13	2
<b>EAR-1R</b>	1	41	3	27	18	6	4
<b>EAR-1,5</b>	1	46	-	23	18	10	2
<b>EAR-1,5R</b>	1	53	-	19	15	10	1
<b>EAR-2</b>	1	43	-	16	10	28	2
<b>EAR-2R</b>	1	43	1	22	10	21	1
<b>EAR-4</b>	1	37	1	8	1	51	1
<b>EAR-4R</b>	4	40	1	12	2	40	-

Por otra parte, a otra muestra también rica en ácidos urónicos (EAH1-0,5), se decidió reducirla con el mismo método descrito anteriormente. La proporción de manosa incrementó en un 23% en la fracción reducida, sugiriendo así la presencia de ácido manurónico.

Seguidamente, con la finalidad de comprobar si este ácido urónico proviene del alginato, se le agrego una solución de CaCl<sub>2</sub> al 10% (EAH1- 0,5P) durante una noche a 4

°C y luego se procedió a dializar y liofilizar, para posteriormente hidrolizar y derivatizar los monosacáridos a alditoles peracetilados.

La Tabla 4.20 indicó que la composición de azúcares componentes casi no mostró variación, lo cual nos sugirió que el ácido manurónico o bien es parte de la molécula del fucoídano o se encuentra de un modo tal que el polisacárido que integra no precipita con los iones calcio.

**Tabla 4.20. Comparación de la composición de monosacáridos de las fracciones obtenidas con precipitación con cetrimide y posterior redisolución con NaCl 0,5 M provenientes del EAH1, la fracción reducida (EAH1-0,5R) y la precipitada con CaCl<sub>2</sub> (EAH1-0,5P) (moles/100 moles de azúcares).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH1-0,5</b>	2	22	1	45	27	2	1
<b>EAH1-0,5R</b>	1	10	5	26	50	-	8
<b>EAH1-0,5P</b>	2	26	-	40	28	2	2

## 4.6. Discusión

En los extractos hidroalcohólicos de una gran variedad de algas, se ha extraído manitol y *Dictyota dichotoma* no constituyó una excepción. Tanto en el extracto a temperatura ambiente como a 70 °C se extrajo este alditol. Cabe señalar que cerca del 40% del peso seco de dicha feofita se extrajo con etanol.

El residuo fue extraído con una solución de ácido clorhídrico a pH 2 durante 7 h a temperatura ambiente. Experiencias previas en nuestro laboratorio nos mostraron que este solvente usualmente maximiza la extracción de los fucoidanos y minimiza la coextracción de proteínas, sin evidenciar signos de degradación<sup>4</sup>.

La composición del fucoidano mostró que el principal monosacárido fue la fucosa (36%), con proporciones importantes de galactosa (23%), xilosa (18%), manosa (14%) y proporciones menores de glucosa (6%). Estos resultados fueron similares a aquellos encontrados previamente de dicha feofita al ser extraídos con HCl y TCA<sup>5</sup>.

En los fucoidanos de las algas pardas, la fucosa suele ser el principal monosacárido, usualmente en proporciones mayores al 70%<sup>4,6-8</sup>, o en proporciones entre el 50 y el 70%, acompañado principalmente por xilosa y galactosa<sup>9-11</sup> o por glucosa, en extractos crudos ricos en laminaranos<sup>12,13</sup>. Sin embargo, es menos común encontrar fucoidanos con proporciones de fucosa menores del 50%, y conteniendo cantidades importantes no sólo de xilosa y galactosa, sino también de manosa y ácidos urónicos. La mayoría de las muestras de polisacáridos heterogéneos han sido encontradas en las algas marinas que pertenecen a la familia *Dictyotaceae* (orden Dictyotales). Estos heterofucanos fueron encontrados en *Dictyota mertensis*<sup>14</sup>, *Dictyota menstrualis*<sup>15</sup>, *Padina tetrastomatica*<sup>16</sup> y *Spatoglossum schröederi*<sup>17</sup>. Hasta donde sabemos, el único extracto originado en las algas marinas pardas fuera de este orden donde se observó una gran heterogeneidad fue en *Hizikia fusiforme*, perteneciente al orden Fucales<sup>18</sup>.

Los dos primeros extractos obtenidos con HCl a 70 °C tuvieron un rendimiento del 2%, mientras que en los siguientes extractos el rendimiento disminuye a un 1,4% (EAH3), llegando hasta un 0,2% (EAH6-EAH9). Al igual que en el extracto obtenido a temperatura ambiente, todos los extractos a 70 °C nos mostraron proporciones altas

tanto de hidratos de carbono (48-52%, salvo el EAH9, 28%) como de ácidos urónicos (32-50%) y grupos sulfato (7-11%). Las proporciones de proteínas del EAH1-EAH6 fueron bajas (3-8%), mientras que para los extractos EAH7-EAH9 fueron más altas (12-17%) y los pesos moleculares en toda la secuencia extractiva fueron bajos (1,2-6,1 KDa).

Considerando los azúcares componentes, EAH1 presentó características de xilomanofuoidano, es decir, el extracto estaba constituido por una alta proporción de fucosa (42%), seguido de xilosa (29%), manosa (16%) y galactosa (8%) y además presentó cantidades ínfimas de glucosa, ramnosa y arabinosa ( $\leq 2\%$ ).

A partir de EAH2 hasta EAH5, se puede apreciar un claro descenso de la cantidad de fucosa, hasta alcanzar el valor más bajo de toda la secuencia extractiva 9% para EAH5, mientras la cantidad de xilosa disminuye a expensas de la cantidad de manosa que gana preponderancia, alcanzando un valor de 55% en EAH5.

En los extractos EAH4 a EAH10, la manosa fue el componente principal (41-55%), acompañada de proporciones menores de fucosa (9-20%), mientras la xilosa disminuye hasta alcanzar un 11% para el EAH9.

Cabe señalar que en la secuencia extractiva la galactosa fue siempre un componente minoritario (5-11%), al igual que la glucosa (1-8%), excepto para EAH9, cuyo valor de glucosa asciende a 14%. Además, la ramnosa y arabinosa en todos los extractos presentaron cantidades ínfimas.

El análisis de las extracciones mostró que el galactofucano/fucano se obtuvo principalmente en EAR y una cantidad importante en EAH1. Las extracciones a 70 °C básicamente presentan ácidos urónicos, manosa y xilosa, evidenciando una estructura diferente. Esto puede ser observado a través de diversas relaciones molares entre los componentes: después de EAH1, las relaciones ácidos urónicos/manosa fueron más o menos constantes, de manera similar ocurre con las proporciones de xilosa/manosa después de EAH4. Estos resultados nos sugirieron que la Xil, Man y los ácidos urónicos son probablemente parte de la misma molécula, en concordancia con estudios realizados por otros investigadores<sup>8,18</sup> y que el galactofucano sulfatado es también un

polisacárido constituyente de estas algas marinas. Los análisis de las relaciones Xil/Fuc y Xil/Man sugirieron que la xilosa aparece sustituyendo a ambos polisacáridos, en los manoglicuronanos y en los galactofucanos.

En los análisis químicos generales del extracto acuoso y del ácido a temperatura ambiente, se pueden observar mucha similitud tanto en la alta cantidad de hidratos de carbono y ácidos urónicos. Por otro lado, se observan proporciones bajas de proteínas, grupos sulfato y peso molecular.

Los resultados mostraron que la cantidad de fucosa, xilosa, ramnosa y manosa del extracto acuoso y ácido a temperatura ambiente fueron muy similares; sin embargo, la cantidad de galactosa disminuyó a expensas de un incremento en la cantidad de glucosa y arabinosa. Este incremento en la cantidad de glucosa del extracto acuoso nos sugería que probablemente hubo una coextracción del fucoidano con el laminarano y que evidentemente debido a la similitud no solo de análisis generales sino también de azúcares componentes, evidencian que el HCl diluido no degradó al fucoidano.

El ácido algínico obtenido tuvo un peso molecular de 4,1 KDa. La composición de los ácidos urónicos del alginato de sodio se realizó a través de la técnica de reducción denominado “metanol mágico” (MM) y con EDC, mostrando una diferencia pequeña en su composición y siempre preponderando el ácido manurónico (58,6% y 62,9%) sobre el ácido gulurónico (41,4% y 37%), respectivamente. Además, los análisis por RMN con  $^{13}\text{C}$ , mostraron dicha preponderancia, presentando una más alta proporción de manosa (76,9%) sobre gulosa (23,1%). Dicha diferencia puede atribuirse a que el análisis por RMN, es un método más sofisticado, analítico y de alto costo. Los desplazamientos químicos mostrados por RMN con  $^{13}\text{C}$  del alginato de sodio no solo corroboraron la presencia de estos dos ácidos urónicos sino que mostraron la presencia de triadas en el alginato de sodio. Las comparaciones de los desplazamientos del  $^{13}\text{C}$  mostraron concordancias con lo señalado por Heyraud y colaboradores<sup>3</sup>.

El fraccionamiento usando la técnica de precipitación con cetrimide mostró ser un método adecuado para fraccionar a los fucoidanos, mostrando una gran dispersión respecto a una gran cantidad de parámetros como los azúcares componentes, hidratos de carbono, cantidad de grupos sulfato, ácidos urónicos, proteínas y peso molecular.

La primera fracción (EAR-0,5) mostró las características generales de un uronofucoidano, es decir, proporciones altas de ácidos urónicos, bajo contenido de grupos sulfato y peso molecular. Además, presentó una gran heterogeneidad significativa de los monosacáridos. Las características analíticas de estos polisacáridos son similares a los xilofucoglucuronano encontrándose en *Spatoglossum schröderi*<sup>17</sup> y *Adenocystis utricularis*<sup>4</sup>.

Las fracciones EAR-1,5, EAR-2 y EAR-5 aparecen ser más compatibles con la estructura de un xilogalactofucoidano altamente sulfatado, con un descenso de la cantidad de ácidos urónicos, mientras que la fracción EAR-4 fue más compatible con la estructura de un fucoxilogalactano sulfatado. En esta fracción, la cantidad de ácidos urónicos y manosa fueron constituyentes menos importantes.

Cabe señalar que en las fracciones (EAR-1,5 hasta EAR-4), la cantidad de galactosa se incrementaba al mismo tiempo que creció la concentración de NaCl, mientras que la proporción de fucosa y xilosa disminuyeron. Simultáneamente, el contenido de grupos sulfato y el peso molecular promedio se incrementaron. La manosa también pareció ser parte de estas moléculas. Por otro lado, la fracción EAR-1 mostró características intermedias entre lo observado en las fracciones EAR-0,5 y EAR-1,5, sugiriendo un cambio estructural continuo. Abdel-Fattah y colaboradores<sup>5</sup> también encontraron fracciones ricas en fucosa, xilosa y galactosa.

La fracción EAR-0 pudo ser subdividida en tres subfracciones (EAR-0A-EAR-0C) por cromatografía por permeación en geles, mostrando que la heterogeneidad persiste, aunque EAR-0C mostró más características de un fucoidano sulfatado, y por otro lado, EAR-0B mostró características de un laminarano. Además, la presencia de todos los monosacáridos, éster sulfato y ácidos urónicos en cada fracción mostró que ellos siguen siendo mezclas de polisacáridos. La presencia de grupos iónicos como los sulfatos y ácidos urónicos en una fracción no precipitada por el detergente catiónico es inusual, pero esto ya se había observado<sup>3</sup>. En todos estos casos, se considera que alguna interacción de los grupos sulfato (probablemente a través de puentes con calcio) impide que estos polisacáridos precipiten con el detergente catiónico. Por otro lado, las restantes fracciones (EAR-0,5 hasta EAR-4), tras ser analizadas por el mismo

método, mostraron ser polidisperas con respecto al peso molecular y si en caso hubiera dos polisacáridos estos evidentemente tendrían similares pesos moleculares.

La fracción EAH1-0,5 presentó características de un uronofucoidano, es decir presentó una proporción alta de ácidos urónicos (51%), acompañado de proporciones pequeñas de grupos sulfato (6%). La composición de azúcares componentes mostró que la xilosa fue el azúcar principal, seguido de Fuc y Man, mientras que para las fracciones EAH1-1 y EAH1-1,5, el azúcar principal fue la fucosa, seguido de cantidades de Xil y Man.

A pesar que las fracciones EAH1-2 y EAH1-4 mostraron rendimientos menores, presentaban mayor peso molecular (18,2 y 18,3 KDa, respectivamente) y mayor proporción de grupos sulfato (21%). Dichas fracciones estaban enriquecidas en galactosa, seguida de fucosa y además presentaban proporciones menores de manosa, xilosa y glucosa.

El fraccionamiento de EAH2 y EAH3, presentó las fracciones EAH2-0,5 y EAH3-0,5 como las más importantes de la secuencia, cuyos rendimientos fueron del 31,9% y 24,9%, respectivamente. Además, dichas fracciones mostraron características muy parecidas, con no sólo proporciones altas de hidratos de carbono y ácidos urónicos sino también proporciones pequeñas de grupos sulfato y peso molecular similar. Las proporciones Xil:Man son casi 1:1, mientras que hay proporciones menores de fucosa.

Cabe señalar que las fracciones EAH2-1 y EAH3-1 mostraron proporciones menores de ácidos urónicos y proporciones más grandes de grupos sulfato que aquellas redisueltas en 0,5 M. Además, con respecto a su composición de azúcares, se observó que las cantidades de xilosa y manosa disminuyeron a expensas de un incremento en la cantidad de fucosa.

El fraccionamiento de EAH4, EAH5 y EAH6, solo dio lugar a una fracción importante, redisuelta en 0,5 M NaCl. Los azúcares componentes y los análisis generales mostraron que estas fracciones tuvieron las características de un xilomanano o xilofucoglicuronano; es decir, presentan altas cantidades de manosa (51-64%), seguido de xilosa (15-30%) y en proporciones pequeñas a la fucosa (6-10%). Además, estas fracciones presentan altas cantidades de hidratos de carbono, ácidos urónicos y están

apenas sulfatadas. Es importante resaltar, que en las proporciones minoritarias presentaba proporciones significativas de glucosa, las cuales posiblemente constituyen a polisacáridos diferentes de laminaranos o almidón florideano. Lamentablemente debido al poco rendimiento de dichas fracciones, en muchas de ellos no se pudieron realizar algunos análisis generales.

Las fracciones EAH7, EAH8 y EAH9, presentan dos subfracciones importantes, las -0 y la redisuelta en 0,5 M NaCl. Las fracciones -0, mostraron una gran heterogeneidad con respecto a sus azúcares componentes y aunque los laminaranos posiblemente están presentes, se ha encontrado a otro polisacárido con características de un uronofucoidano, el cual no interaccionó con el detergente catiónico.

Las otras fracciones importantes fueron las -0,5, que al igual que las encontradas previamente, presentaban cantidades altas de ácidos urónicos que pueden estar mezclados o combinados con xilomananos.

Cabe señalar que a pesar que las fracciones (EAH7-1-EAH7-2) fueron minoritarias, estas no sólo mostraron características de un xilomanano sino que presentaban cantidades significativas de arabinosa (16-20%), azúcar que no es común de encontrar en las algas pardas. Cabe señalar que Madgel-Din Hussein y colaboradores<sup>19</sup> encontraron oligosacáridos después de una hidrólisis parcial de una fracción purificada de *D. dichotoma* teniendo Xil y Man como sus principales constituyentes.

Los xilomananos sulfatados han sido encontrados dentro del orden de los *Nemaliales* de las algas rojas. Usualmente tienen un *core* basado en  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-manano con ramificaciones de  $\beta$ -D-xilopiranosas en el C-2<sup>20-22</sup> o en otras posiciones<sup>24,25</sup>. También se ha encontrado un xilomanano sulfatado diferente, cuyo esqueleto presenta uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) con sustitución de xilosa en C-6 para dos algas rojas en el orden de *Ceramiales*<sup>26</sup>.

La Tabla 4.17 mostró una comparación de los monosacáridos provenientes de las fracciones obtenidas en EAR y las reducidas con EDC, en la cual se pudo observar que la gran mayoría de fracciones obtenidas a temperatura ambiente (EAR-1-EAR-4) no hubo diferencias marcadas en cuanto a la composición de monosacáridos, más que

aquellas mínimas, contempladas en el error esperado. Solo la fracción EAR-0,5, rica en ácidos urónicos, mostró un notable aumento en la composición de la manosa, de 16% en el EAR-0,5 a un 43% en el EAR-0,5R, lo cual nos mostró que el ácido manurónico o bien proviene de una eventual contaminación del ácido algínico o es parte de la molécula.

## Conclusiones

- El etanol acuoso al 80% permitió extraer solo al manitol, como carbohidrato de bajo peso molecular más importante, acompañado de proporciones pequeñas de otros componentes.
- El ácido clorhídrico fue un solvente adecuado para extraer el fucoidano, siendo las cinco primeras extracciones las necesarias para extraer casi todo el polisacárido.
- Las fracciones extraídas se caracterizaron por presentar altas proporciones de hidratos de carbono, ácidos urónicos, bajo peso molecular y grupos sulfato. Además, el fucoidano mostró ser complejo, presentando fucosa, xilosa, manosa y galactosa en proporciones variables.
- La feofita *Dictyota dichotoma*, así como otras especies del género *Dictyota*, produjo grandes cantidades de polisacáridos heterogéneos dentro de las fracciones de fucoidanos.
- La fracción soluble presentó cantidades importantes de glucosa, al parecer principalmente de los laminaranos, acompañada de grupos iónicos como ácidos urónicos y grupos sulfato, además presentó bajas proporciones de fucosa, xilosa y manosa. Es posible que ocurra una interacción entre los grupos iónicos y el calcio (probablemente a través de puentes calcio) que impiden la interacción de estos grupos aniónicos con el cetrimide.
- Sólo el fraccionamiento con cetrimide de los dos primeros extractos, es decir el extracto con ácido a temperatura ambiente (EAR) y el primer extracto con ácido en caliente (EAH1), apareció un típico galactofucano sulfatado, con cantidades muy pequeñas de otros azúcares componentes. En todos los casos, estas subfracciones son menores cuando son comparados con aquellas que contienen fucosa con proporciones importantes de xilosa, manosa y ácidos urónicos, redissueltos a concentraciones bajas de NaCl del mismo extracto. La fucosa dejó de ser el monosacárido más importante en la mayoría de las subfracciones en los siguientes extractos. Las proporciones de manosa, xilosa y ácidos urónicos se incrementaban en la misma medida que lo hacen los fucanos típicos en los componentes minoritarios en todo el sistema de polisacáridos de esta alga marina.

- La extracción con agua a temperatura ambiente nos mostró que el fucoidano extraído con ácido a temperatura ambiente no se degradó.
- El alginato de sodio obtenido mostró la preponderancia del ácido manurónico sobre el ácido gulurónico. Además, los análisis mostraron que parecen triadas de dichos ácidos urónicos.
- El ácido urónico proveniente de las fracciones redisueltas en 0,5 M de NaCl es el ácido manurónico, que o bien es parte de la molécula del fucoidano o por alguna razón no pudo interactuar con la sal de calcio.

## Referencias

1. Taylor R.L. y Conrad H.E. "Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups". *Biochemistry*, 1972, **11**, 1383-1388.
2. Usov A.I., Bilan M.I. y Klochkva N.G. "Polysaccharide of algae 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: Isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae)". *Botanica Marina*, 1995, **38**, 43-51.
3. Heyraud A., Gey C., Leonard C., Rochas C., Girond S. y Kloareg B. "NMR spectroscopy analysis of oligoguluronates and oligomannuronates prepared by acid or enzymatic hydrolysis of homopolymeric blocks of alginic acid. Application to the determination of the substrate specificity of *Haliotis tuberculata* alginate lyase". *Carbohydrate Research*, 1996, **19**, 11-23.
4. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 153-165.
5. Abdel-Fattah A.F., Hussein M.-D. y Fouad T. "Carbohydrates of the brown seaweed *Dictyota dichotoma*". *Phytochemistry*, 1978, **17**, 741-743.
6. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag.". *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 719-730.
7. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L.". *Carbohydrate Research*, 2004, **339**, 511-517.
8. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*". *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 2038-2047.
9. Duarte M.E.R., Cardoso M.A., Nosedá M.D. y Cerezo A.S. "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **333**, 281-293.
10. Wang H., Vincent E. y Ang P.O. "Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds". *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, **9**, 969-976.

11. Bandyopadhyay S.S., Heidary M., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulphated polysaccharides from *Sphacelaria indica*". *Phytochemistry*, 2011, **72**, 276-283.
12. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L.". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 238-245.
13. Foley S.A., Mulloy B. y Tuohy M.G. "An Unfractionated Fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: Extraction, Characterization, and Apoptotic Effects *in Vitro*". *Journal of Natural Products*, 2011, **74**, 1851-1861.
14. Queiroz K.C.S., Medeiros V.P., Queiroz L.S., Abreu L.R.D., Rocha H.A.O., Ferreira C.V., Jucá M.B., Aoyama H. y Leite E.L. "Inhibition of reverse transcriptase of HIV by polysaccharides of Brown seaweed". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2008, **62**, 303-307.
15. Albuquerque I.R.L., Queiroz K.C.S., Alves L.G., Santos E.A., Leite E.L. y Rocha H.A.O. "Heterofucans from *Dictyota menstrualis* have anticoagulant activity". *Brazilian Journal Medical and Biological Research*, 2004, **37**, 167-171.
16. Karmakar P., Ghosh T., Sinha S., Saha S., Mandal P., Ghosal P.K. y Ray B. "Polysaccharides from the Brown seaweed *Padina tetrastratica*: Characterization of a sulphated fucan". *Carbohydrate Polymers*, 2009, **78**, 416-421.
17. Leite E.L., Medeiros M.G.L., Rocha H.A.O., Farias G.G.M., Da Silva L.F., Chavante S.F., de Abreu L.D., Dietrich C.P. y Nader H.B. "Structure and pharmacological activities of a sulphated xylofucoglucuronan from the alga *Spatoglossum schroederi*". *Plant Science*, 1998, **132**, 215-228.
18. Li B., Wei X.J., Sun J.L. y Xu S.-Y. "Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 1135-1146.
19. Magdel-Din Hussein M., Fouad S.T. y Abdel-Fattah A.F. "Structural features of a sulphated, fucose-containing polysaccharide from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*". *Carbohydrate Research*, 1979, **72**, 177-181.
20. Usov A.I., Adamyants K.S., Yarotskii S.V. y Anoshina A.A. "Polysaccharides of algae  
16. Study of the structure of the sulphated mannan from the red alga *Nemalion vermiculare* Sur". *Zhurnal Obshchei Khimii*, 1975, **45**, 916-921.

21. Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "Water-soluble sulphated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structure of the  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked mannans". *Carbohydrate Research*, 1987, **7**, 121-132.
22. Kolender A.A., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "Structural analysis of antiviral sulphated  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked mannans". *Carbohydrate Research*, 1995, **273**, 17-185.
23. Pérez M.M., Nosedá M.D., Pujol C.A., Carlucci M.J. y Matulewicz M.C. "Sulphated mannans from the red seaweed *Nemalion helminthoides* of the South Atlantic". *Phytochemistry*, 1999, **70**, 1062-1068.
24. Usov A.I. y Dobkina I.M. "Polysaccharide of algae 38. Polysaccharide composition of the red alga *Liagora* sp and structure of the sulphated xylomannan". *Bioorganicheskaya Khimiya*, 1988, **14**, 642-651.
25. Mandal P., Pujol C.A., Carlucci M.J., Chattopadhyay J., Damonte E.B. y Ray B. "Anti-herpetic activity of a sulphated xylomannan from *Scinaia hatei*". *Phytochemistry*, 2008, **6**, 2193-2199.
26. Cardoso M.A., Cardoso M.A., Nosedá M.D., Fuji M.T., Zibetti R.G.M. y Duarte M.E.R. "Sulphated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil". *Carbohydrate Research*, 2007, **342**, 2766-2775.

# Capítulo 5

---

## Elucidación estructural de los fucoidanos

---

## **5.1. Introducción**

Con la finalidad de conocer la estructura química del fucoidano extraído de un alga parda, se suele proceder en dos etapas. Como hemos visto en el Capítulo 4, en la primera etapa se utilizan métodos químicos (por ejemplo, colorimétricos) para la determinación de hidratos de carbono, sulfato, proteínas, ácidos urónicos y peso molecular y cromatografía para la determinación de los azúcares componentes. En la segunda etapa, se realiza la elucidación estructural analizando la posición de unión glicosídica de los azúcares componentes, y la configuración de dicha unión, teniendo en cuenta las ramificaciones a lo largo de la cadena polisacáridica y los sustituyentes como grupos sulfato, acetato, metoxilo, etc.

Los métodos químicos que se usan para determinar la estructura primaria de los polisacáridos son el análisis por metilación, la desulfatación seguida de metilación (para los polisacáridos con azúcares sulfatados), mientras que el método espectroscópico más utilizado es el análisis por resonancia magnética nuclear incluyendo la bidimensional (HSQC). Todos ellos han sido utilizados en la presente tesis doctoral.

## **5.2. Elucidación estructural de EAR**

### **5.2.1. Estudios de metilación**

La técnica de metilación es, tradicionalmente, la más importante en la elucidación de la estructura de un polisacárido, ya que no solo brinda información de la posición de unión, sino también del tamaño del anillo, terminales no reductores y puntos de ramificación. La técnica de metilación se basa en la formación de los iones alcóxido a partir del polisacárido, para luego agregarle un agente metilante, que reacciona mediante una  $S_N2$  con los grupos alcóxido. La hidrólisis posterior genera una mezcla de monosacáridos parcialmente metilados, cuya identidad y proporción brindan una enorme ayuda en la determinación estructural del polisacárido original.

El uso de la técnica de metilación en los fucoidanos no es sencillo, debido a las dificultades prácticas para completarla. Para este fin, se han desarrollado una serie de métodos. El método clásico y todavía utilizado, es el descrito por Haworth en el año 1915<sup>1</sup> que emplea hidróxido de sodio acuoso concentrado como base y sulfato de

dimetilo como agente alquilante. La principal dificultad de este método radica en que la metilación no se completa en un solo paso, y a veces necesita reiteradas adiciones o agregar otro procedimiento, lo que convierte en una técnica tediosa. Este método fue reemplazado en buena medida por otro generado por Hakomori en el año 1964<sup>2</sup> el cual, al menos en teoría, permite la metilación en una sola etapa. El método consiste en disolver el polisacárido en dimetilsulfóxido anhidro, tratarlo primero con el carbanión dimetilsulfínico ( $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_2^-$ ), generado previamente con hidruro de sodio y dimetilsulfóxido, y luego agregar en una o más etapas yoduro de metilo como agente alquilante.



Esta técnica presenta la dificultad que algunos polisacáridos (por ejemplo, los altamente sulfatados) son insolubles en dimetilsulfóxido. Este problema fue solucionado en parte por Stevenson y Furneaux<sup>3</sup>, quienes propusieron transformar al polisacárido en la correspondiente sal de trietilamonio, antes de efectuar la metilación, para mejorar su solubilidad. También Ciucanu y Kerek<sup>4</sup>, presentaron una modificación a la técnica de Hakomori, empleando hidróxido de sodio pulverizado en lugar del carbanión derivado del DMSO. Esta última técnica es la más utilizada en la actualidad. Años más tarde, Renard y colaboradores<sup>5</sup> metilaron un polisacárido previamente eluído de una resina catiónica en la forma ( $\text{H}^+$ ). Más recientemente, Bilan y colaboradores han propuesto transformar el polisacárido en su correspondiente sal de piridinio, antes de efectuar la metilación, con buenos resultados para polisacáridos sulfatados<sup>1</sup>. Debe recordarse que una sal de piridinio es más ácida que una de trietilamonio, lo que la convierte en más lábil.

En el caso de las algas pardas se presenta un problema adicional debido a que en sus productos suele ser común encontrar porcentajes variables de ácidos urónicos. La investigación de la estructura mediante hidrólisis parcial y metilación, seguida de hidrólisis del material metilado, se dificulta a causa de la estabilidad incrementada de

los enlaces glicosídicos de los residuos de ácidos urónicos y también por la inestabilidad de los propios ácidos urónicos frente a los ácidos una vez hidrolizados.

Además, la presencia de estos grupos cargados negativamente en medio alcalino contribuye a dificultar la metilación completa de los polisacáridos<sup>2</sup>.

Cabe señalar que todos los métodos pueden producir despolimerización debido al medio alcalino en que se lleva a cabo la metilación, siendo el mejor método dependiente de las características propias de cada polisacárido.

### 5.2.1.1. Metilación de las fracciones

Se decidió efectuar la técnica descrita por Stevenson y Furneaux<sup>3</sup> con la modificación realizada por Ciucanu y Kerek<sup>4</sup>, variando las cantidades de reactivos y los tiempos de reacción sobre la fracción EAR-4. El procedimiento consistió en disolver la sal de Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> del polisacárido en DMSO durante 2 h, para luego agregar hidróxido de sodio y agitar durante 30 min; posteriormente se agregó yoduro de metilo y se agitó durante otros 30 min. El análisis de los productos indicó un porcentaje alto de submetilación evidenciado por un 83% de azúcares sin metilar (Tabla 5.1). Sólo una pequeña parte de la galactosa logró metilarse.

**Tabla 5.1. Composición de azúcares de toda la fracción EAR-4 metilada según la técnica descrita por Stevenson y Furneaux (moles/100 moles de azúcar).**

Fracción	EAR-4
Posición del O-metilo	
<b>Galactosa</b>	
2,3,4	10
6	4
3	3
-	37
<b>Fucosa</b>	
-	35
<b>Manosa</b>	
-	1
<b>Xilosa</b>	
-	9
<b>Glucosa</b>	
-	1

Como resultado de la gran cantidad de monosacáridos sin metilar, evidenciada por la abundante submetilación, se decidió aplicar la técnica descrita por Renard y colaboradores<sup>5</sup>. Al polisacárido en su forma ácida se lo disolvió en DMSO durante una noche, luego se le agregó hidróxido de sodio y yoduro de metilo durante 30 min. Los análisis de metilación (Tabla 5.2) mostraron que la fracción soluble (EAR-0) presentaba una cantidad importante de 2,4,6-tri-*O*-metilglucosa, lo cual nos indica que los residuos de glucosa se encuentran enlazados en 3, además de presentar grupos terminales de galactosa y xilosa.

Con respecto a las demás fracciones (EAR-0,5-EAR-4), se observó que los residuos de manosa se encontraban enlazados en diversas posiciones, mientras que la galactosa mostró cantidades importantes trimetiladas en 2, 4 y 6-, lo que indica que estos residuos se encuentran enlazados en 3, aunque se observan uniones en las cuatro posiciones posibles. La fracción EAR-4 mostró cantidades importantes de residuos de galactosa enlazados en 6. Además, EAR-2 y EAR-4 mostraron cantidades considerables de galactosa dimetiladas en 2, 4- y 3, 4- lo que también es compatible con la presencia de galactosa enlazada en 6, portando sulfatos o ramificaciones en 2- y en 3-.

Con respecto a la fucosa, se observó una gran dispersión con respecto a sus azúcares constituyentes, ya que sus unidades se encontraban unidas tanto en 2, como en 3 ó en 4. Además, se observó una gran cantidad de residuos de fucosa y xilosa como terminales no reductores, lo que podría haberse originado, al menos en parte, por degradación ácida a raíz del intercambio iónico con H<sup>+</sup> en el paso previo a la metilación.

A partir de estos resultados, se decidió probar otro método de metilación que ya se había realizado en nuestro laboratorio<sup>6</sup>. La sal de trietilamonio del polisacárido previamente preparada en una columna, se disolvió en DMSO calentando a 50 °C hasta lograr su disolución total con agitación constante. Posteriormente, se agregó hidróxido de sodio y yoduro de metilo, agitándolo durante 30 min a temperatura ambiente y a 50 °C, repitiendo este ciclo por tres veces (Tabla 5.3).

Tabla 5.2. Composición de azúcares de todas las fracciones provenientes del EAR metilados según Renard y colaboradores<sup>5</sup> (moles/100 moles de azúcar).

Fracción	EAR-0	EAR-0,5	EAR-1	EAR-1,5	EAR-2	EAR-4
<b>Posición del O-metilo</b>						
<b>Galactosa</b>						
2,3,4,6	-	2	-	-	3	4
2,4,6	-	3	7	3	10	5
2,3,6	-	3	1	-	1	2
2,3,4	-	1	2	2	3	12
3,4,6	2	-	-	1	3	2
3,6	3	-	1	1	1	1
2,4	-	-	2	1	7	6
3,4	-	-	-	2	7	7
6	3	-	-	-	1	1
2	-	-	-	-	3	3
3 ó 4	-	-	-	-	2	5
-	-	-	1	1	1	4
<b>Fucosa</b>						
2,3,4	6	14	15	16	5	14
2,3	2	4	4	3	6	5
2,4	-	4	4	2	3	2
3,4	3	8	7	8	3	5
2	-	2	3	3	2	3
3	-	-	-	3	4	-
4	6	1	9	5	3	2
<b>Manosa</b>						
2,3,4,6	-	1	2	4	tz.	5
3,4,6	7	5	5	5	4	1
2,4,6	-	2	-	-	-	tz.
4,6	-	3	3	4	6	-
2,4	-	-	-	-	1	2
3,4	5	6	6	5	4	1
3	-	9	-	7	6	2
-	5	5	4	4	3	-
<b>Xilosa</b>						
2,3,4	10	19	16	9	3	3
2,4	3	3	-	2	tz.	-
2,3 ó 3,4	-	4	6	7	4	1
<b>Glucosa</b>						
2,3,4,6	22	-	-	-	-	-
2,4,6	12	-	-	-	-	-
2,3,6	8	-	-	-	-	-
-	3	1	2	2	1	2

Tabla 5.3. Composición de azúcares de todas las fracciones provenientes del EAR metiladas según el método de Ponce et al.<sup>6</sup> (moles/100 moles de azúcar).

Fracción	EAR-0,5	EAR-1	EAR-1,5	EAR-2	EAR-4
<b>Posición del O-metilo</b>					
<b>Galactosa</b>					
2,4,6	2	6	11	8	7
2,3,6	-	2	-	1	1
2,3,4	-	1	-	3	5
3,4,6	8	1	1	3	1
2,6	4	3	5	4	6
2,3	-	1	-	1	2
2,4	-	3	2	4	17
3,4	-	-	-	2	3
2	-	-	1	4	3
3 ó 4	-	-	-	2	10
-	2	-	-	1	1
<b>Fucosa</b>					
2,3,4	15	10	7	8	3
2,3	-	5	5	8	7
2,4	-	2	3	2	6
3,4	11	6	3	5	1
2	-	2	7	2	3
3	-	4	6	4	2
4	-	10	8	4	7
<b>Manosa</b>					
2,3,4,6	-	2	-	1	-
4,6	-	2	5	4	2
3	5	8	7	5	1
-	7	3	2	1	1
<b>Xilosa</b>					
2,3,4	30	17	11	8	1
2,4	10	-	-	10	-
2,3 ó 3,4	5	5	8	-	6
2	1	1	2	2	1
-	-	6	4	2	1
<b>Glucosa</b>					
-	-	-	2	1	2

El análisis de metilación mostró para los residuos de galactosa una diferencia clara entre EAR-4, EAR-0,5 y el resto de fracciones. Para EAR-1, -1,5 y -2 al observar las trimetiladas, parece haber una preponderancia de unidades enlazadas en 3, lo que se ratifica al observar las dimetiladas, que indican que la segunda sustitución (seguramente sulfatación) se daría en 4- y en 6-. EAR-0,5 mostró preponderancia de uniones en 2-, mientras que EAR-4 mostró una elevada cantidad de su derivado metilado en 2 y 4, lo que indica grandes cantidades de galactosa sustituida en 3 y en 6. Una buena parte de la misma también estaría sustituida en 2. La fucosa presentó una heterodispersión con respecto a su modo de sustitución (hay uniones en 2-, en 3- o en 4-), aunque puede observarse un comportamiento dependiente de la solubilidad de la fracción: a medida que la fracción se redissolvió a concentraciones mayores de NaCl, disminuyó la proporción de fucosa terminal (indicada por la 2,3,4-tri-*O*-metilfucosa) y la proporción de unión por la posición 2-, mientras que aumentaba la proporción de uniones en las posiciones 3- y 4-. La manosa se encontró en proporciones moderadas, la mayoría con alta sustitución: o bien en 2- y en 3-, o bien en 2, 4 y en 6. Al igual que ocurría con la fucosa, la proporción de xilosa terminal disminuyó a medida que aumentaba la solubilidad de la fracción que le dá origen. En EAR-0,5 y EAR-2 se observaron residuos de xilosa enlazados en 3, que están ausentes en las demás fracciones; uniones en 2- o en 4- se observaron en todas las fracciones excepto en EAR-2.

Este mismo método de metilación se utilizó para los extractos obtenidos a 70 °C (EAH) y algunas veces se tuvo que realizar dicho procedimiento tres veces. Como era de esperar, un aumento en el número de secuencias de metilación resultó en un importante incremento en las unidades metiladas<sup>7</sup>.

La Tabla 5.4 mostró los resultados para las subfracciones metiladas de EAH1 y EAH2. En EAH1-1 los residuos de galactosa se encontraron principalmente enlazados en 3, mientras que la fucosa presentaba una preponderancia de azúcares monometilados en las tres posiciones posibles, indicando diversas combinaciones. La manosa también presentó básicamente sustituciones en 2, 4 y en 6 y la xilosa se encontró principalmente como azúcar terminal no reductora, acompañada de proporciones

menores de xilosa enlazada en 2 y proporciones muy chicas de xilosa enlazada en 3 o en 4 .

La fracción EAH1-1,5 metilada hasta en tres oportunidades (EAH1-1,5 N°3), mostró una estructura algo diferente. Esta estructura apareció como más ramificada, dada la mayor proporción de residuos terminales no reductores de xilosa y fucosa. Además, la fucosa y xilosa se encontraron principalmente enlazadas en 2, y la galactosa en 2 o en 3.

La fracción EAH1-2 mostró altas proporciones de galactosa enlazada en 6 y de xilosa enlazada en 2. Además, mostró proporciones muy chicas de fucosa enlazada en 2 o en 4, y manosa dimetilada en 4 y 6- y monometilada en 3-.

La metilación de EAH2-0,5 es compatible con la presencia de un *core* de manosa con sustitución en 2 y en 4. Además, se observó la presencia de altas proporciones de residuos de galactosa enlazados en 2, con algunas ramificaciones o sulfato en 6. La xilosa se encontraba principalmente como terminal no reductora. La fucosa se encontró enlazada en 2 o en 4. En las demás fracciones de EAH2 los modelos de sustitución no fueron tan claros.

Tabla 5.4. Análisis por metilación de las fracciones provenientes de EAH1 y EAH2 (moles/100 moles de azúcar).

Fracción Posición del O-metilo	EAH1-1	(EAH1-1,5) N° 1	(EAH1-1,5) N°3	EAH1-2	EAH2-0	EAH2-0,5	EAH2-1	EAH2-1,5
<b>Galactosa</b>								
2,4,6	13	7	3	3	5	-	-	3
2,3,4	-	-	-	22	2	-	-	6
2,3,6	-	-	-	-	4	-	-	-
3,4,6	1	-	3	1	2	16	1	-
3,4	-	2	2	6	-	8	1	-
2,6	-	-	1	6	3	3	3	-
2,4	1	-	2	6	2	-	-	3
3	-	-	-	4	-	-	-	-
<b>Fucosa</b>								
2,3,4	3	15	16	7	3	2	7	8
2,3	6	2	4	2	2	4	2	4
2,4	3	-	1	-	2	-	-	-
3,4	2	7	7	3	1	4	4	6
2	6	-	-	-	2	1	1	-
3	9	6	3	-	-	-	-	7
4	11	-	2	1	2	-	1	-
<b>Manosa</b>								
3,4,6	-	-	-	-	6	-	-	-
2,3,4	-	-	7	-	-	-	-	-
4,6	4	4	2	3	2	-	2	4
3,4	-	-	-	-	5	-	12	-
3,6	-	-	-	-	-	30	-	-
2,4	-	9	7	-	-	-	-	-
3	7	-	4	2	3	-	-	6
-	4	-	1	2	4	6	1	-
<b>Xilosa</b>								
2,3,4	15	29	24	9	15	19	41	28
2,3 ó 3,4	6	15	10	13	5	-	8	15
2	2	2	-	5	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	2	14	1
-	3	-	-	-	-	4	-	9
<b>Glucosa</b>								
2,3,6	-	-	-	-	15	-	-	-
-	2	-	-	2	5	1	-	-

Tabla 5.5. Análisis por metilación de las fracciones provenientes de EAH3-EAH9 (moles/100 moles de azúcar).

Fracción	EAH3-0	EAH3-0,5	EAH3-1	EAH4-0,5	EAH5-0,5	EAH6-0,5	EAH7-0,5	EAH8-0,5	EAH9-0	EAH9-0,5
<b>Galactosa</b>										
2,3,4,6	4	-	-	-	-	-	-	-	5	-
2,4,6	3	3	3	-	2	6	4	-	2	7
2,3,6	2	-	-	-	-	-	-	1	-	-
2,3,4	2	-	2	1	4	-	-	2	3	-
3,4,6	3	-	-	-	-	-	7	4	-	-
3,6	1	-	-	-	-	-	-	-	5	10
3,4	-	1	2	-	-	-	5	2	-	-
4,6	1	-	-	-	-	-	-	1	-	-
2,6	1	1	-	5	-	-	-	1	-	-
2,4	1	2	2	1	-	-	-	2	-	-
2,3	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-
6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	4	2	-	13	-	6	2	2	-	-
<b>Fucosa</b>										
2,3,4	3	-	1	2	-	-	3	1	4	4
2,3	-	-	6	-	-	-	3	1	-	-
2,4	-	-	-	-	-	29	-	-	12	-
3,4	-	1	2	-	-	-	2	-	-	6
3	-	-	7	-	-	-	-	2	-	-
4	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-
<b>Manosa</b>										
3,4,6	8	-	-	-	-	12	4	33	30	-
4,6	1	1	3	1	9	-	5	-	-	10
3,4	13	13	-	-	-	18	20	17	14	29
3	4	4	5	2	14	-	2	-	2	-
6	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
-	8	-	4	23	11	24	8	-	5	11
<b>Xilosa</b>										
2,3,4	25	42	35	20	16	-	27	14	12	10
2,3 ó 3,4	6	1	5	1	4	-	3	1	3	4
2	4	-	1	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	1	15	-	-	-	-	-	-
-	-	25	12	14	20	-	-	-	-	-
<b>Glucosa</b>										
-	5	3	6	4	9	5	5	8	4	9

Los análisis de metilación de los productos principales del fraccionamiento del EAH3-EAH9 se observaron en la Tabla 5.5. La estructura de las fracciones EAH3-0 y -0,5 mostró un importante componente de manosa unido en 2 o en 6, así como alta proporción de residuos de xilosa como grupos terminales no reductores. Aparece poca fucosa, y la galactosa en forma variada. En EAH3-1, se observó una gran variedad de uniones para la fucosa y siguió manteniéndose la alta proporción de xilosa terminal. La fracción EAH4-0,5 se mostró fuertemente submetilada, por lo que no es posible conjeturar sobre sus modos de unión; sin embargo, se observaron proporciones moderadas de xilosa enlazadas en 2 o en 4 y proporciones chicas de galactosa dimetiladas en 2 y en 6, y manosa monometilada en 3. También la xilosa apareció en grandes proporciones como terminal no reductora.

La fracción EAH5-0,5 mostró características parecidas: alta submetilación, altas proporciones de xilosa terminal y ausencia de derivados de fucosa, por lo que no se podría sugerir una estructura probable.

La fracción EAH6-0,5 fue considerablemente diferente. Hay menos indicios de submetilación, y aparece menor diversidad de unidades metiladas: se encontraron altas proporciones de residuos de manosa unidos en 2 y ramificados o sulfatados en 6, además, se mostraron altas proporciones de residuos de fucosa enlazados en 3 y proporciones más chicas de residuos de galactosa unidos en 3.

En las fracciones EAH7-EAH9 se observaron patrones similares, al menos para la manosa, mostrando características de un xilomanano. El *core* se basó en residuos de manosa con uniones en 2 y ramificaciones en 6, y la xilosa se encontró fundamentalmente en forma de grupos terminales no reductores. Cabe señalar que en EAH9-0, al igual que ocurría en EAH6-0,5, se observó la presencia de fucosa enlazada en 3, como único derivado de este azúcar.

### 5.2.2. Desulfatación de las fracciones

Los estudios de desulfatación de los polisacáridos se llevan a cabo para saber la posición de unión de los grupos sulfato en los mismos. Esto se puede lograr por comparación entre el estudio por metilación del polisacárido nativo y un estudio por metilación del polisacárido desulfatado. La diferencia entre las posiciones sustituidas en uno y otro caso brinda datos de la ubicación de los grupos sulfato<sup>8</sup>.

Los métodos utilizados tradicionalmente fueron la desulfatación ácida y la solvolítica. La desulfatación ácida ha sido ampliamente usada para algas rojas<sup>9-11</sup>. La desventaja de este método es que suele producir despolimerización del polisacárido, especialmente si las uniones no son lo suficientemente estables; por este motivo resulta apropiado para polisacáridos con ácidos urónicos<sup>12</sup> y para aquellos que poseen altas proporciones de azúcares metilados<sup>13,14</sup>.

Frente a estos resultados, la desulfatación solvolítica surgió como una alternativa frente a los inconvenientes que presentaba la desulfatación ácida<sup>15,16</sup>. Las desulfataciones solvolíticas se basan en convertir primero el polisacárido a su sal de piridinio (u otra sal de amonio), para luego agregarle algunas de las siguientes combinaciones de solventes: DMSO-piridina, DMSO-H<sub>2</sub>O/MeOH, DMSO-MeOH-piridina, durante varias horas a 80-100 °C. Este método suele dar buenos resultados pero requiere la elección de un catión y de un solvente adecuado para cada polisacárido y en algunos casos la reacción no es eficiente, como informaron Stortz y Cerezo<sup>17</sup>.

Con la finalidad de encontrar un método apropiado para la desulfatación de los fucooidanos, Navarro y colaboradores<sup>18</sup> en nuestro laboratorio hicieron un amplio estudio para desulfatar a los polisacáridos usando un método solvolítico asistido por microondas logrando reducir el tiempo a algunos minutos, usando un recipiente de teflón de 50 mL con tapa roscada. Al polisacárido se lo convirtió previamente en su correspondiente sal de piridinio, para luego agregar DMSO-piridina, y finalmente colocarlo en un horno comercial a microondas utilizando 6 pulsos de 10 s, con enfriamiento rápido sobre hielo hasta alcanzar una temperatura de enfriamiento menor a 55 °C, siempre abriendo el recipiente tras cada pulso.

Con este método la desulfatación ocurrió casi completamente y sólo presentó una degradación pequeña con rendimientos aceptables; por su parte, los análisis de metilación *in situ* mostraron resultados similares a aquellos obtenidos en tres pasos<sup>6</sup>.

Este método fue utilizado en el presente trabajo de tesis doctoral. Ante la escasa cantidad de material se seleccionaron sólo algunas fracciones para realizar la desulfatación. Los resultados generados por el proceso de desulfatación pueden observarse en la Tabla 5.6.

**Tabla 5.6. Proporción de grupos sulfato y rendimiento de los polisacáridos desulfatados.**

Muestra	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (%)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> -DS (%)	Diferencia		Rendimiento
EAR-0,5	13	2,7	10,3	(-79,2%)	68,7%
EAR-1	24	2,3	21,7	(-90,4%)	58,4%
EAR-1,5	30	7,0	23,0	(-76,7%)	69,6%
EAR-2	33	3,6	29,4	(-89,0%)	72,4%
EAR-4	34	2,6	31,4	(-92,4%)	59,0%
EAH1-1	14	4,0	10,0	(-71,4%)	59,1%
EAH1-1,5	19	4,6	14,4	(-75,8%)	63,1%
EAH2-0,5	10	7,7	2,3	(-23,0%)	67,0%
EAH2-1	18	n.d	n.d	n.d	56,3%
EAH2-1,5	18	10,1	7,9	(-43,9%)	64,0%

También se desulfataron las muestras EAH3-0,5, EAH4-0,5, EAH5-0,5, EAH6-0,5 y EAH7-0,5, obteniéndose un rendimiento de 61-72%. Como se puede observar, el grado de desulfatación fue casi siempre superior al 50%, llegando a un máximo de 92,4% para la fracción EAR-4. Los rendimientos de reacción fueron buenos (56-72%) con pequeñas diferencias dependiendo de la muestra tratada.

Además, se realizaron los análisis de azúcares componentes sobre los productos desulfatados con la finalidad de corroborar la constancia de monosacáridos y por ende determinar alguna posible pérdida sistemática de algún monosacárido en la reacción (Tablas 5.7 y 5.8).

**Tabla 5.7. Composición de monosacáridos de fracciones de EAR y EAH1 desulfatados por el método solvolítico de Navarro et al.<sup>18</sup> (moles/100 moles de azúcar).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAR-0,5</b>	2	40	2	30	16	6	4
<b>(EAR-0,5)D</b>	3	26	3	35	20	8	5
<b>EAR-1</b>	1	41	-	27	16	13	2
<b>(EAR-1)D</b>	2	36	2	26	27	6	2
<b>EAR-1,5</b>	1	46	-	23	18	10	2
<b>(EAR-1,5)D</b>	4	54	-	18	17	6	1
<b>EAR-2</b>	1	43	-	16	10	28	2
<b>(EAR-2)D</b>	1	39	-	18	14	27	1
<b>EAR-4</b>	1	37	1	8	1	51	1
<b>(EAR-4)D</b>	2	32	1	8	2	56	-
<b>EAH1-1</b>	1	47	-	23	22	6	1
<b>(EAH1-1)D</b>	-	54	-	27	16	2	1
<b>EAH1-1,5</b>	2	41	-	26	25	5	1
<b>(EAH1-1,5)D</b>	1	33	-	30	23	7	4

- Las fracciones cuyo acrónimo termina en "D", corresponden a las fracciones desulfatadas.

**Tabla 5.8. Composición de monosacáridos de EAH2-EAH7 desulfatados por el método solvólico de Navarro et al.<sup>18</sup> (moles/100 moles de azúcar).**

<b>Azúcares componentes</b>	<b>Ram</b>	<b>Fuc</b>	<b>Ara</b>	<b>Xil</b>	<b>Man</b>	<b>Gal</b>	<b>Glc</b>
<b>EAH2-0,5</b>	1	26	-	36	33	4	-
<b>(EAH2-0,5)D</b>	1	29	-	36	30	3	1
<b>EAH2-1</b>	1	22	3	36	29	5	4
<b>(EAH2-1)D</b>	-	32	1	29	31	3	3
<b>EAH2-1,5</b>	2	37	-	26	24	8	3
<b>(EAH2-1,5)D</b>	1	32	-	22	36	7	2
<b>EAH3-0,5</b>	1	12	-	41	41	2	3
<b>(EAH3-0,5)D</b>	1	10	4	42	39	3	3
<b>EAH4-0,5</b>	1	10	-	30	51	5	3
<b>(EAH4-0,5)D</b>	1	7	-	35	51	2	5
<b>EAH5-0,5</b>	2	7	1	15	64	5	6
<b>(EAH5-0,5)D</b>	-	7	3	31	52	7	-
<b>EAH6-0,5</b>	1	6	-	21	62	5	5
<b>(EAH6-0,5)D</b>	-	4	1	23	67	3	3
<b>EAH7-0,5</b>	-	11	-	19	57	7	6
<b>(EAH7-0,5)D</b>	-	8	-	25	54	8	5

- Las fracciones cuyo acrónimo termina en "D", corresponden a las fracciones desulfatadas.

Comparado a las fracciones originales, las fracciones desulfatadas suelen mostrar pequeñas disminuciones en los porcentajes de fucosa, aumentando la cantidad de otros azúcares, aunque esto resulta variable.

#### **5.2.2.1. Metilación de los productos desulfatados**

Con la finalidad de conocer la estructura básica del polisacárido (y a partir de allí, la posición de los grupos sulfato), se procedió a metilar los productos desulfatados *in situ* (Tablas 5.9-5.11).

Tabla 5.9. Composición de monosacáridos metilados de todas las subfracciones provenientes de metilación y desulfatación-metilación de EAR (moles/100 moles de azúcar).

Fracción Posición del O-metilo	EAR-0,5	(EAR-0,5)D	EAR-1	(EAR-1)D	EAR-1,5	(EAR-1,5)D	EAR-2	(EAR-2)D	EAR-4	(EAR-4)D
<b>Galactosa</b>										
2,3,4,6	-	1	-	2	-	3	-	6	-	8
2,4,6	2	1	6	2	11	2	8	3	7	2
2,3,6	-	1	2	-	-	1	1	-	1	1
2,3,4	-	1	1	-	-	2	3	5	5	20
3,4,6	8	-	1	-	1	2	3	1	1	2
2,6	4	1	3	-	5	-	4	-	6	2
4,6	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
3,6	-	1	-	2	-	1	-	1	-	-
2,3	-	8	1	-	-	-	1	-	2	-
2,4	-	1	3	1	2	1	4	2	17	1
3,4	-	-	-	1	-	-	2	3	3	9
2	-	-	-	-	1	-	4	-	3	1
3	-	-	-	-	-	-	2	-	10	-
-	2	-	-	-	-	1	1	-	1	-
<b>Fucosa</b>										
2,3,4	15	13	10	14	7	28	8	27	3	16
2,3	-	-	5	1	5	4	8	3	7	1
2,4	-	-	2	1	3	1	2	-	6	-
3,4	11	3	6	9	3	9	5	8	1	3
2	-	1	2	2	7	-	2	-	3	-
3	-	-	4	-	6	-	4	-	2	-
4	-	-	10	2	8	1	4	1	7	-
<b>Manosa</b>										
2,3,4,6	-	2	2	-	-	-	1	2	-	17
3,4,6	-	2	-	5	-	3	-	3	-	1
4,6	-	1	2	3	5	2	4	1	2	-
3,4	-	6	-	6	-	4	-	3	-	2
3	5	5	8	5	7	4	5	2	1	-
-	7	5	3	3	2	2	1	2	1	2
<b>Xilosa</b>										
2,3,4	30	40	17	17	11	20	8	15	1	4
2,4	10	1	-	12	-	3	10	2	-	-
3,4	5	3	5	2	8	7	-	7	6	5
2	1	-	1	1	2	-	2	2	1	-
-	-	-	6	-	4	-	2	-	1	-
<b>Glucosa</b>										
-	-	1	-	1	2	1	1	-	2	1

Tabla 5.10. Composición de monosacáridos metilados provenientes de las subfracciones de EAH1 y EAH2 (moles/100 moles de azúcar).

Fracción	EAH1-1	(EAH1-1)D	EAH1-1,5	(EAH1-1,5)D	EAH2-0,5	(EAH2-0,5)D	EAH2-1	(EAH2-1)D	EAH2-1,5	(EAH2-1,5)D
<b>Posición del O-metilo</b>										
<b>Galactosa</b>										
2,3,4,6-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	5
2,4,6-	13	2	7	1	-	-	-	3	3	2
2,3,4-	-	1	-	4	-	-	-	2	6	3
3,4,6-	1	1	-	-	16	-	1	-	-	2
3,4-	-	1	2	1	8	-	1	1	-	1
3,6	-	1	-	-	-	-	-	2	-	1
2,6-	-	-	-	-	3	-	3	-	-	-
2,4-	1	1	-	-	-	3	-	1	3	4
2	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	1
<b>Fucosa</b>										
2,3,4-	3	14	15	26	2	9	7	6	8	15
2,3-	6	-	2	1	4	2	2	7	4	-
2,4-	3	1	-	-	-	-	-	2	-	-
3,4-	2	3	7	3	4	3	4	2	6	2
2-	6	-	-	-	1	-	1	-	-	-
3-	9	-	6	-	-	-	-	-	7	-
4-	11	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<b>Manosa</b>										
2,3,4,6-	-	3	-	5	-	15	-	-	-	-
3,4,6-	-	8	-	9	-	10	-	8	-	12
2,3,4-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-
4,6-	4	3	4	-	-	1	2	5	4	3
3,4-	-	7	-	7	-	11	12	10	-	9
3,6-	-	-	-	-	30	-	-	-	-	-
2,4-	-	-	9	-	-	-	-	-	-	-
3-	7	6	-	2	-	3	-	7	6	3
-	4	-	-	2	6	2	-	4	-	3
<b>Xilosa</b>										
2,3,4-	15	19	29	26	19	37	41	24	28	20
2,4	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1
3,4-	6	3	15	4	-	3	8	4	15	6
2-	2	-	2	-	-	-	-	2	-	1
3-	-	-	-	-	2	-	14	-	1	-
-	3	-	-	-	4	-	-	-	9	-
<b>Glucosa</b>										
-	2	2	-	3	1	1	-	3	-	2

La Tabla 5.9 mostró el análisis por metilación de los productos desulfatados provenientes de EAR, que dan lugar un panorama muy complejo. La fucosa en las fracciones EAR-1-EAR-4 mostró un claro desplazamiento hacia la 2,3,4-tri-*O*-metilfucosa y la 3,4-di-*O*-metilfucosa de parte de otras unidades, fundamentalmente monometiladas. Evidentemente, muchas unidades de fucosa terminales se encuentran sulfatadas, y existe una buena proporción de las mismas unidas en 2- y sulfatadas en 3. En EAR-0,5 se observan pocas variaciones.

Para la manosa se observó una disminución de la 3-*O*-metilmanosa, mientras que la 3,4-di-*O*-metilmanosa y la 3,4,6-tri-*O*-metilmanosa se incrementaban. Estas variaciones indicaban la presencia de manosas enlazadas en 2, con grupos sulfato en la posición 4 y ramificaciones en C-6. En algunas fracciones la 4,6-di-*O*-metilmanosa disminuyó a expensas de la 3,4,6-tri-*O*-metilmanosa, indicativa que también la manosa estaba enlazada en C-2 y los grupos sulfato están en *O*-3. En la galactosa, se observó que en todas las fracciones hay un descenso de la unidad trimetilada en 2,4,6-, mientras que la tetrametilada en 2,3,4,6- se encontraba aumentada, lo que sugiere que unidades de galactosa terminales se encontraban sulfatadas en *O*-3. La xilosa se mostró como un azúcar terminal no reductor en todos los extractos, el resto de unidades metiladas mostró un comportamiento más difícil de racionalizar.

La fracción EAR-4 mostró una conducta claramente diferente: la 2,3,4-tri-*O*-metilgalactosa creció a expensas de la dimetilada en 2 y 4, indicando uniones en 6 y sulfato en *O*-3. A su vez, el incremento de 3,4-di-*O*-metilgalactosa a expensas del 3-*O*-metilgalactosa debería explicarse del mismo modo, pero agregando una ramificación en *O*-2. En esta fracción la xilosa terminal fue claramente minoritaria.

Los análisis de metilación de los productos desulfatados de algunas fracciones de EAH1 y EAH2 se mostraron en la Tabla 5.10. Estas fracciones mostraron cantidades moderadas de grupos sulfato (14-23%). Los análisis de metilación de los productos desulfatados nos mostraron que los azúcares que más incrementaban su grado de metilación por desulfatación fueron la fucosa y la manosa, sugiriendo que son los más sulfatados.

En todas las fracciones excepto EAH2-1 se observó un incremento en la 2,3,4-tri-*O*-metilfucosa a expensas de la 2,3-di-*O*-metilfucosa, sugiriendo la presencia de grupos sulfato en la posición 4 de las fucosas terminales. Además, para la manosa se observó un incremento de la 3,4-di-*O*-metilmanosa, la 3,4,6-tri-*O*-metilmanosa y la 2,3,4,6-tetra-*O*-metilmanosa a expensas de distintos azúcares (fundamente la 3,6-di-*O*-metilmanosa en EAH2-0,5), lo que sugiere que *O*-2 es la principal posición de unión, mientras *O*-6 sería un punto de ramificación. También habría manosas terminales sulfatadas.

En la Tabla 5.11 se pudo observar el análisis por metilación de los productos desulfatados de las fracciones EAH3-EAH7 redisueltas en 0,5 M de NaCl. Estas fracciones presentaban proporciones pequeñas de grupos sulfato (5-9%) y fueron ricas en xilosa y manosa. En las fracciones EAH3-0,5, EAH6-0,5 y EAH7-0,5 se observaron incrementos en la 3,4,6-tri-*O*-metilmanosa a expensas fundamentalmente de la 3,4-di-*O*-metilmanosa, sugiriendo uniones en *O*-2 y grupos sulfato en *O*-6, mientras que en la fracción EAH5-0,5 se observó un incremento de la 3,4-di-*O*-metilmanosa a expensas de la 3-*O*-metilmanosa, indicando la presencia de manosa con uniones también en *O*-2 y grupos sulfato en *O*-4. Por otro lado, la fracción EAH4-0,5 no mostró un claro panorama a partir de la desulfatación. La xilosa se encontró fundamentalmente como grupos terminales no reductoras.

**Tabla 5.11. Composición de azúcares de las fracciones provenientes del EAH3-EAH5 (moles/100 moles de azúcar).**

Fracción Posición del O-metilo	EAH3-0,5	(EAH3-0,5)D	EAH4-0,5	(EAH4-0,5)D	EAH5-0,5	(EAH5-0,5)D	EAH6-0,5	(EAH6-0,5)D	EAH7-0,5	(EAH7-0,5)D
<b>Galactosa</b>										
2,3,4,6-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	1
2,4,6-	3	-	-	-	2	-	6	-	4	-
2,3,6-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-
2,3,4-	-	1	1	-	4	2	-	2	-	2
3,4,6	-	-	-	2	-	2	-	2	7	2
3,6-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	5
3,4-	1	-	-	1	-	1	-	-	5	-
4,6-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-
2,6-	1	-	5	-	-	-	-	-	-	-
2,4-	2	3	1	4	-	2	-	-	-	-
2,3	-	-	-	-	8	-	-	-	-	-
6-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
-	2	-	13	1	-	-	6	-	2	1
<b>Fucosa</b>										
2,3,4-	-	6	2	3	-	3	-	2	3	1
2,3-	-	-	-	1	-	-	-	3	3	1
2,4-	-	1	-	-	-	1	29	-	-	4
3,4-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	-
3-	-	-	-	3	-	3	-	5	-	-
4-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<b>Manosa</b>										
2,3,4,6-	-	12	4	-	-	10	-	-	-	-
3,4,6-	-	19	26	-	-	32	12	40	4	36
4,6-	1	-	1	1	9	1	-	1	5	1
3,4-	13	11	23	15	-	13	18	11	20	14
3-	4	3	2	2	14	-	-	2	2	2
6-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
-	-	2	-	3	-	3	24	3	8	6
<b>Xilosa</b>										
2,3,4-	42	39	20	26	16	20	-	13	27	11
2,4-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-
3,4-	1	1	1	2	4	1	-	-	3	1
3-	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-
-	25	-	14	-	-	-	-	-	-	-
<b>Glucosa</b>										
-	3	1	4	1	-	1	5	13	-	8

### 5.2.3. Análisis por experimentos de RMN bidimensionales de correlación

#### C-H

Con la finalidad de ampliar la elucidación estructural del sistema de polisacáridos, éstos también se analizaron usando métodos espectroscópicos como la RMN bidimensional, particularmente el método conocido como HSQC (del inglés, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*). El espectro se realiza en dos dimensiones: en un eje se grafica el espectro de RMN- $^1\text{H}$  y en el otro un RMN heteronuclear (en este caso, RMN- $^{13}\text{C}$ ). El espectro permite inferir qué hidrógenos están unidos a qué carbonos.

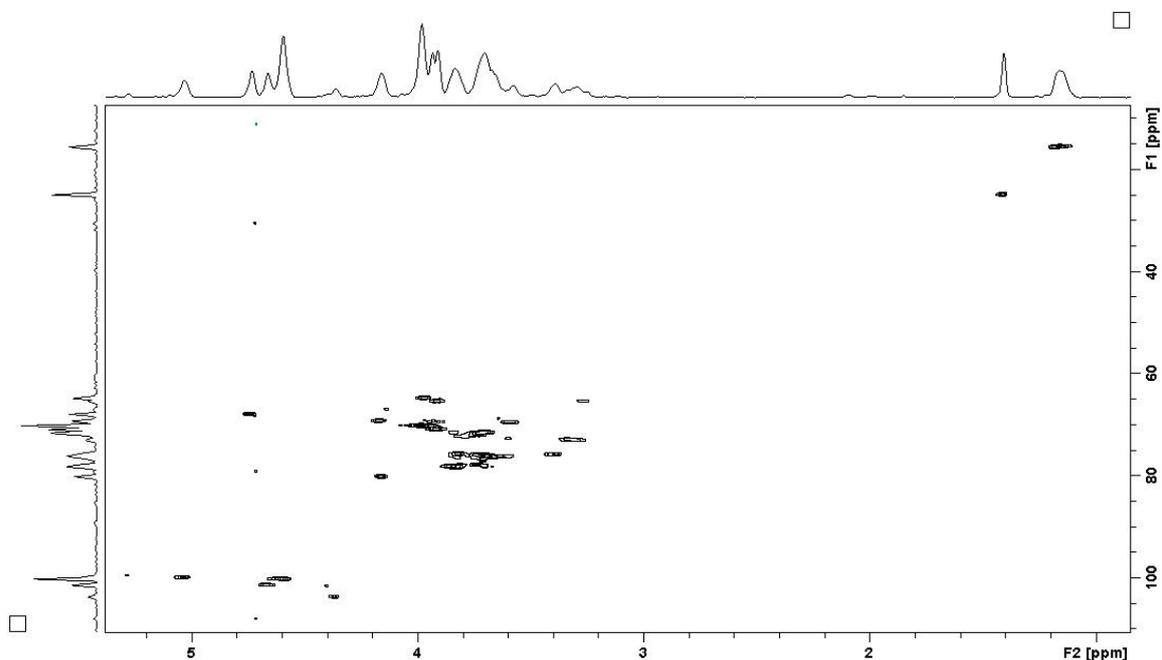
Las señales de RMN fueron asignadas por comparación con datos de la literatura, fundamentalmente aquellos obtenidos por Usov y colaboradores sobre fucoidanos del alga *Saccharina latissima*<sup>19</sup>. Ellos analizaron todas las fracciones obtenidas tanto por métodos químicos como por métodos espectroscópicos tales como HSQC, HMQC-TOCSY y HMQC-NOESY. Además, estas asignaciones fueron confirmadas por ese grupo no sólo con los espectros de la literatura de fucoidanos sino también con oligosacáridos sintetizados.

En la Figura 5.1 se mostró el espectro HSQC de la fracción EAR-0,5, en el cual se pueden observar tres zonas bien definidas: la comprendida entre 93 y 106 ppm para  $^{13}\text{C}$  correspondiente a las señales de los carbonos anoméricos; la región entre 65 y 83 ppm que contiene casi la totalidad de las señales originadas en los carbonos 2, 3, 4 y 5; y la resonancia del C-6 del grupo metilo de la fucosa, aparece ubicada entre 16,5<sup>20,21</sup> y 17,3 ppm<sup>22</sup>. La región del espectro correspondiente a los carbonos 2-5 resulta especialmente compleja de analizar dada la superposición de señales que existe, la baja intensidad de algunas de estas y el ancho de banda. En consecuencia, la mayor parte de los análisis aprovechables de estos espectros se basaron en la región anomérica<sup>23</sup>.

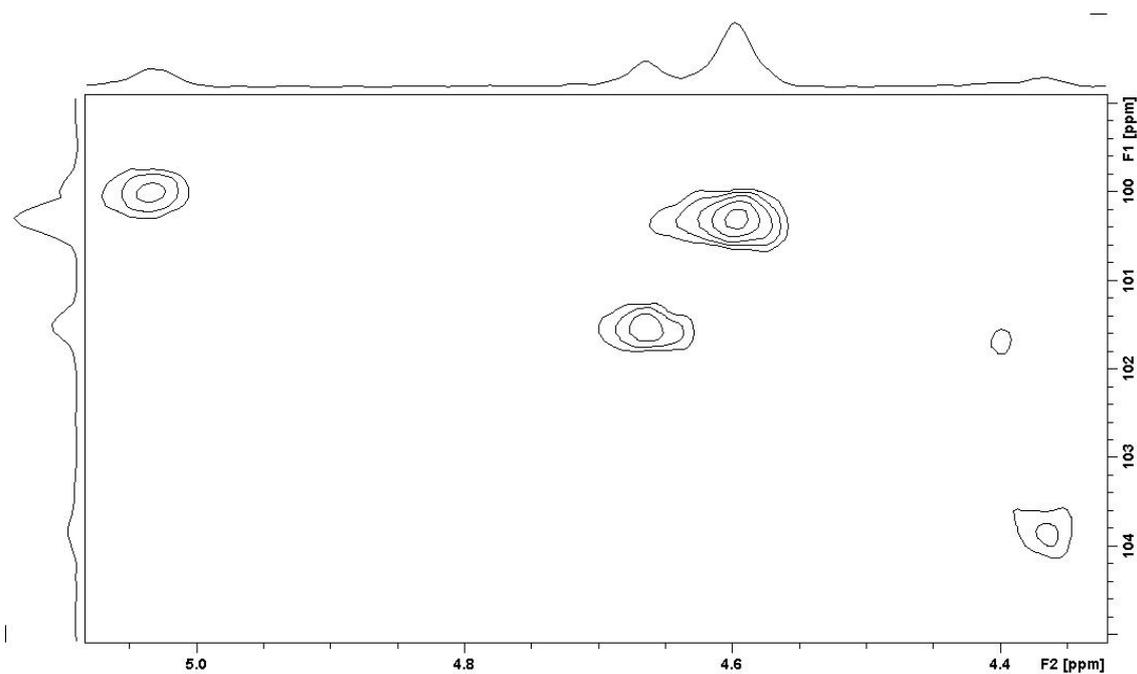
Cabe señalar que las señales de los hidrógenos anoméricos se encontraron por encima de los 4,2 ppm; alrededor de 4,4-4,5 ppm se encontraron las correspondientes a las unidades de configuración  $\beta$ , mientras que por encima de 5 ppm estaban las asignadas a las unidades de configuración  $\alpha$ <sup>23,24</sup> para los residuos de fucosa, xilosa, galactosa y

manosa. Por otro lado, las señales de carbonos anoméricos por encima de 102 ppm corresponden a las de configuración  $\beta$  y corresponden a los residuos de galactosa y xilosa, mientras que los que se encontraban por debajo de 102 ppm corresponden a las unidades de configuración  $\alpha$ , que suelen provenir de fucosa y manosa.

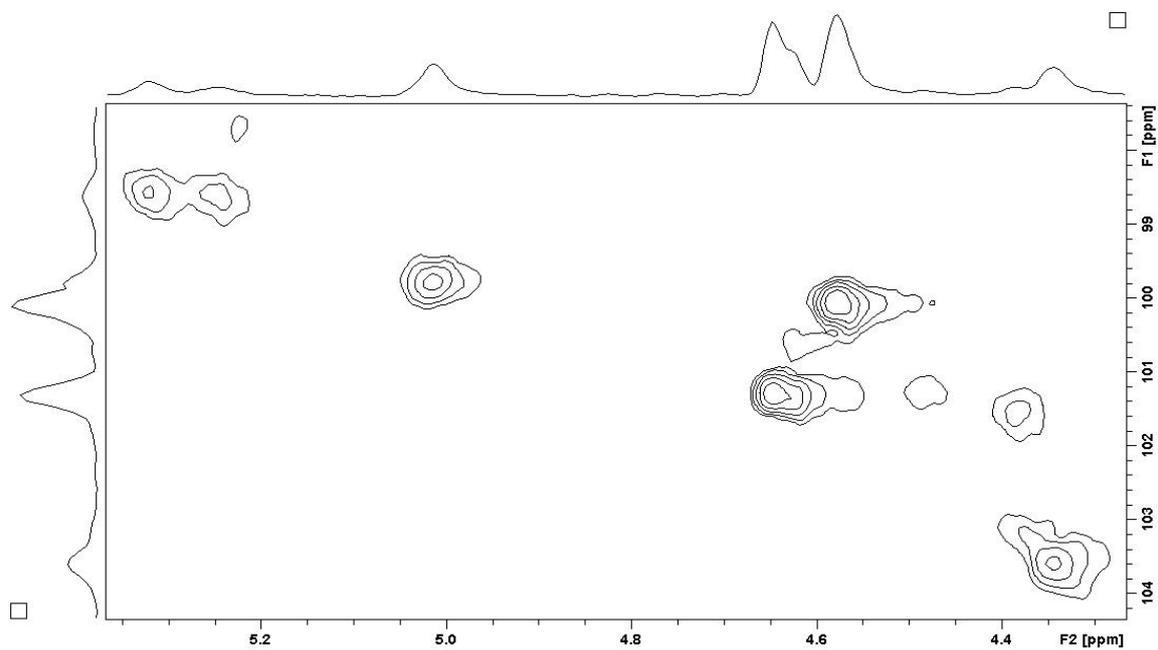
En las Figuras 5.2-5.8 se mostraron los espectros de HSQC correspondientes a las fracciones EAR-0,5, EAH2-0,5, EAH3-0,5, EAH4-0,5, EAH5-0,5, EAH7-0,5 y EAH9-0,5, respectivamente y sus desplazamientos en la región anomérica de estas fracciones se observaron en las Tablas 5.12 y 5.13.



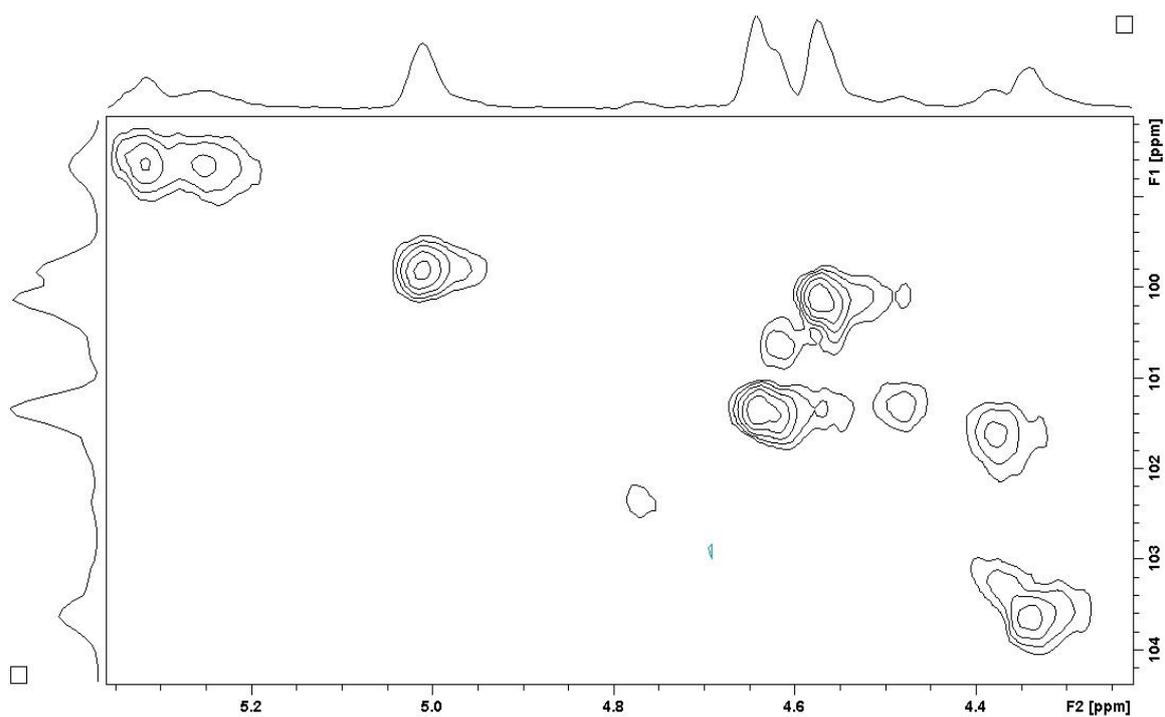
**Figura 5.1. Espectro HSQC (500 MHz) de la fracción EAR-0,5 en D<sub>2</sub>O a temperatura ambiente.**



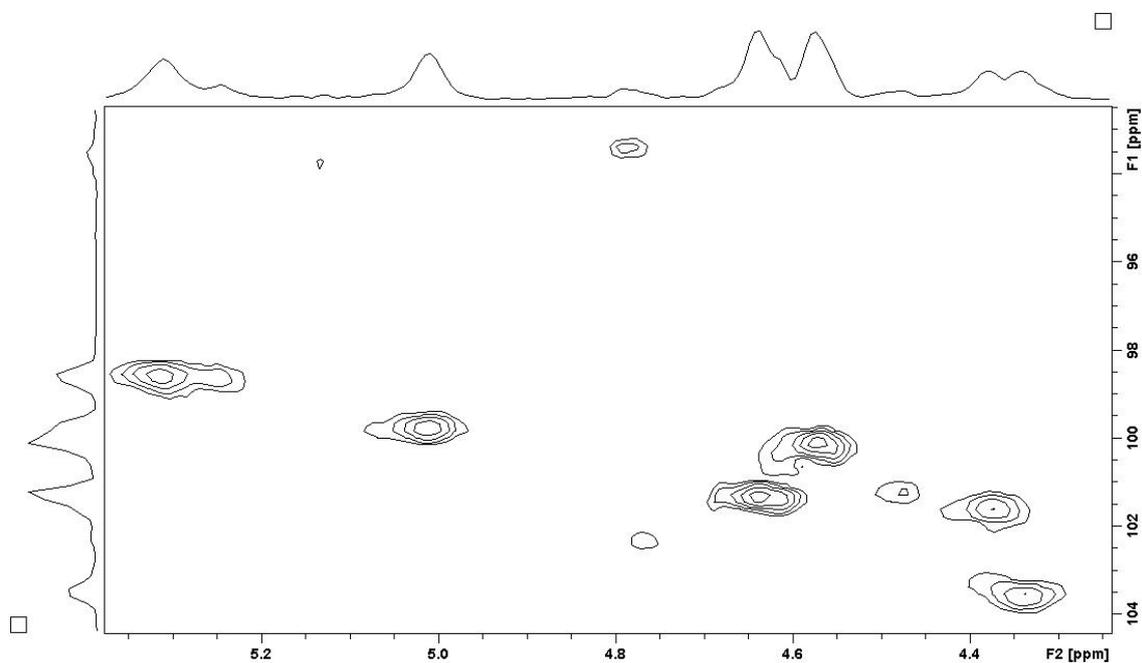
**Figura 5.2.** Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAR-0,5.



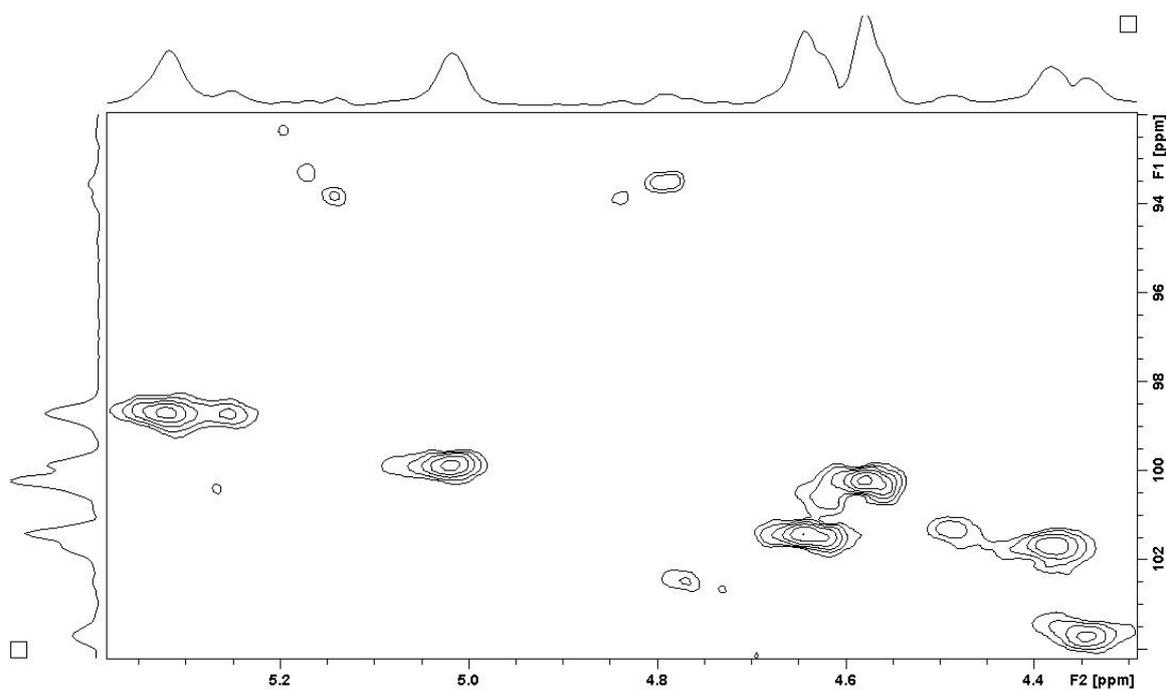
**Figura 5.3.** Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH2-0,5.



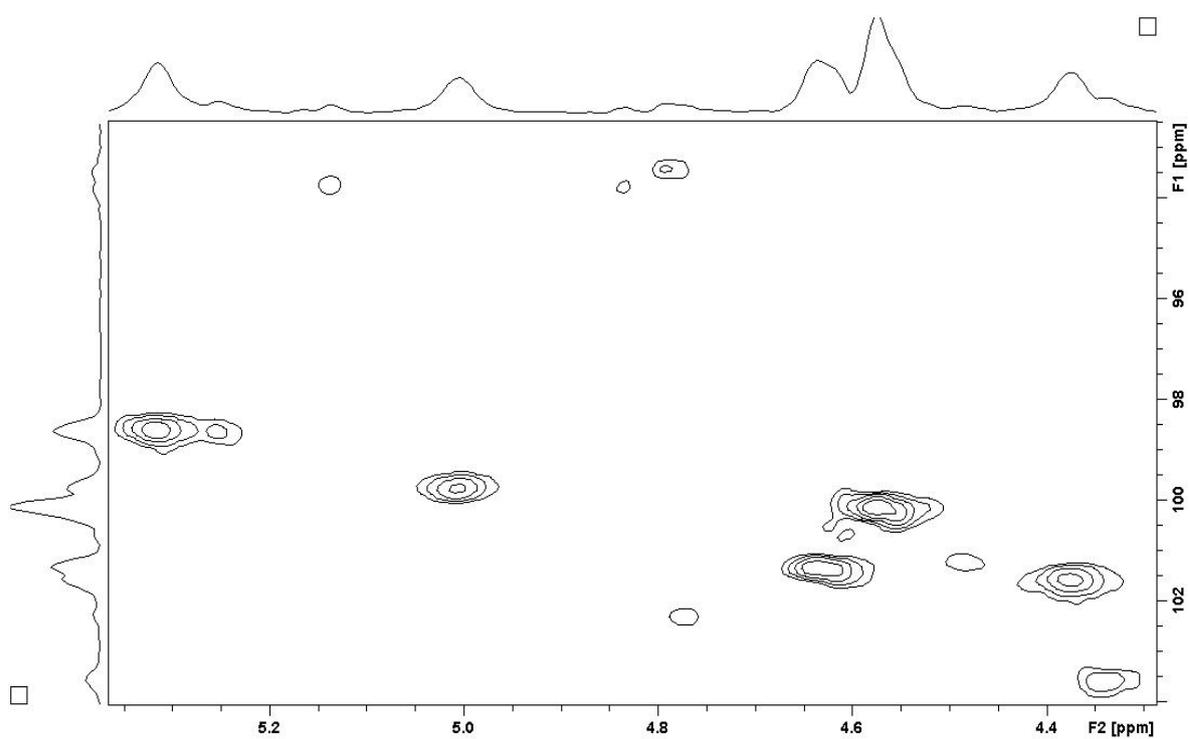
**Figura 5.4. Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH3-0,5.**



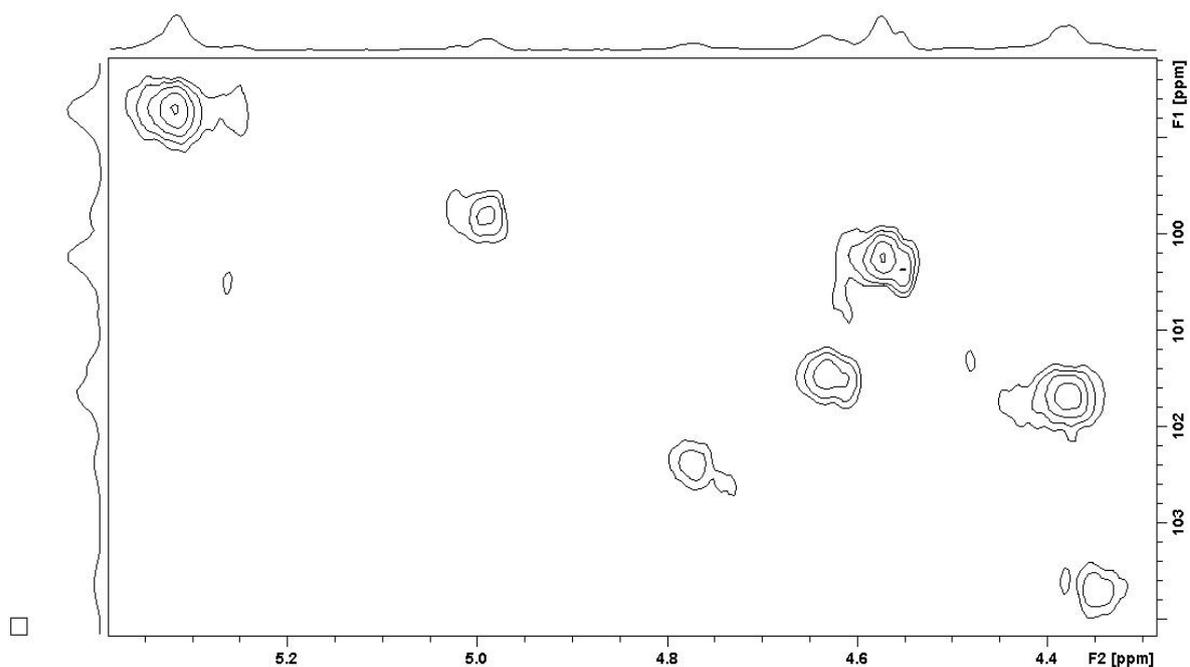
**Figura 5.5. Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH4-0,5.**



**Figura 5.6.** Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH5-0,5.



**Figura 5.7.** Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH7-0,5.



**Figura 5.8. Ampliación de la región anomérica del HSQC (500 MHz) de la fracción EAH9-0,5.**

En la fracción EAR-0,5 se observó el desplazamiento químico 101,6/4,40 que fue asignada a  $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -L-Fucp 4-S, además también se observó que hay una señal con desplazamiento químico en 101,7/4,60 lo cual sugiere que la fucosa probablemente se encuentre unida a dos residuos diferentes.

Las demás fracciones EAH2-EAH9 redisueltas en 0,5 M mostraron características de xilomanano, lo cual se evidencia en los análisis de HSQC con la señal a 98,7/5,26 compatible con un *core* de  $\rightarrow 2$ )- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$  y la señal a 103,7/4,37 compatible con la presencia de unidades de  $\beta$ -D-xilosa como residuos terminales, mientras la señal a 101,3/4,48 es compatible con la presencia de residuos de xilosa unidos en 2, tal como indicaron Vinogradov y colaboradores<sup>25</sup>.

Con respecto a la fucosa, al parecer estaría presente principalmente unida en C-3 ya que la señal a 99,9/5,01 aparece en todas las fracciones<sup>26</sup>.

Tabla 5.12. Desplazamientos químicos (ppm) de la región anomérica de los espectros de HSQC de los polisacáridos de la feofita *D. dichotoma*.

Fracción/Unidad	$\delta$ (ppm)	
	C-1	H-1
<b><u>EAR-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	103,7	4,37
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Fucp 4-S	{ 101,6	4,40
	{ 101,7	4,60
	100,0	5,04
	99,5	5,29
<b><u>EAH2-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	103,6	4,34
$\alpha$ -L-Fucp 4-S (1 $\rightarrow$ 2)	101,6	4,38
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	{ 101,3	4,48
	{ 101,3	4,64
	100,0	4,57
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ )	99,8	5,01
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ )	{ 98,6	5,32
	{ 98,6	5,24
$\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)-	97,7	5,22
<b><u>EAH3-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	103,6	4,34
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	102,4	4,77
$\alpha$ -L-Fucp 4-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (1 $\rightarrow$ 2)	101,6	4,38
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	{ 101,3	4,48
	{ 101,4	4,64
$\rightarrow$ 3, $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	100,7	4,62
	100,0	4,57
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ )	99,8	5,01
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ )	98,8	5,25
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ )	98,7	5,31
<b><u>EAH4-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	103,6	4,34
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	102,4	4,77
$\alpha$ -L-Fucp 4-SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (1 $\rightarrow$ 2)	101,6	4,38
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$ )	{ 101,2	4,48
	{ 101,3	4,64
	100,0	4,57
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ )	99,8	5,01
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$ )	98,8	5,31

Tabla 5.13. Desplazamientos químicos (ppm) de la región anomérica de los espectros de HSQC de los polisacáridos de la feofita *D. dichotoma*.

Fracción/Unidad	$\delta$ (ppm)	
	C-1	H-1
<b><u>EAH5-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	103,6	4,34
$\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	102,4	4,77
$\alpha$ -L-Fucp 4-S (1 $\rightarrow$ 2)	101,6	4,38
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	101,3	4,49
	100	4,57
	100,4	5,27
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$	99,9	5,01
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Manp-(1 $\rightarrow$	98,8	5,32
<b><u>EAH7-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	103,6	4,34
	102,3	4,78
$\alpha$ -L-Fucp 4-S (1 $\rightarrow$ 2)	101,6	4,38
	{ 101,3	4,48
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	{ 101,3	4,63
$\rightarrow$ 3, $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 4)-	100,7	4,61
	100,0	4,57
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$	99,8	5,01
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$	{ 98,7	5,26
	{ 98,7	5,31
<b><u>EAH9-0,5</u></b>		
$\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	{ 103,6	4,34
	{ 103,6	4,38
	102,4	4,77
$\alpha$ -L-Fucp 4-S (1 $\rightarrow$ 2)	101,7	4,38
	{ 101,5	4,63
$\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Xil-(1 $\rightarrow$	{ 101,3	4,48
	{ 100,5	5,26
	{ 100,3	4,57
$\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$	99,8	4,99
$\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$	98,7	5,31

### 5.3. Discusión

Los patrones de metilación y desulfatación-metilación de los productos del sistema de fucoidanos de *Dictyota dichotoma* son extremadamente complejos. Esto se debe no sólo a la gran heterodispersión con respecto a sus azúcares componentes sino además al gran número y diversidad de unidades estructurales (muchas de ellas en cantidades pequeñas) que se han hallado. Estos patrones, los cuales no se han encontrado en polisacáridos de plantas, son característicos de estos productos<sup>27-29</sup>.

Las fracciones EAR-1 y EAR-1,5 mostraron proporciones moderadas de  $\rightarrow 2$ )-Man-(1 $\rightarrow$ , con grupos sulfato en O-4 y una ramificación en C-6, que probablemente corresponde a cadenas de  $\beta$ -D-xilosa enlazada en 2 o bien directamente como grupos terminales. También se observa la presencia de manosa enlazada en 2, con grupos sulfato en O-3.

Los residuos de fucosa mostraron distintas proporciones de enlaces en C-2, C-3 y C-4. De los análisis de los productos desulfatados se deduce que la fucosa enlazada en 2 presenta sustituciones por los grupos sulfato en O-4.

Todas las fracciones mostraron proporciones reducidas de galactosa como grupos terminales, con grupos sulfato en O-3 y dimetiladas en 2,4-, es decir proporciones moderadas de  $\rightarrow 6$ )-Gal-(1 $\rightarrow$ , con grupos sulfato en O-3, presentando proporciones altas la fracción EAR-4. Además, esta fracción presentaba gran cantidad de galactosas monometiladas en 3, lo cual podría deberse también a unidades de  $\rightarrow 6$ )-Gal-(1 $\rightarrow$ , con grupos sulfato en O-2 y O-4. Lamentablemente no se pudo determinar exactamente la forma de unión entre los residuos de fucosa y galactosa. En la fracción EAR-0,5, los residuos de manosa monometilada en 3 no muestran variación en el desulfatado, indicando que la manosa está enlazada en 2 y que tiene ramificaciones en C-4 y C-6, probablemente por residuos de xilosa como grupos terminales que a su vez tendrían sulfato sobre O-3. La fucosa y galactosa se mostraron en proporciones moderadas enlazadas en 2, aunque también se observaron residuos de fucosa como grupos terminales no reductores. Los análisis de HSQC nos confirmaron la presencia de manosa enlazada en 2 y D-galactosa enlazada en 6.

Esta compleja estructura también se encontró en *Sargassum stenophyllum*<sup>30</sup> donde la galactosa estaba enlazada en 6, la manosa enlazada en 2, con ramificaciones de

cadena de fucosa enlazadas en 3 y/o 4, además también se encontró xilosa como grupo terminal no reductora y ácido glucurónico y glucosa enlazadas en 4. Cabe señalar que la literatura ha mostrado varios ejemplos de galactosa enlazada en 6 y manosa enlazada en 2. Las feofitas *Saccharina latissima*<sup>19</sup> e *Hizikia fusiforme*<sup>31</sup> también presentaron una estructura muy compleja, con un core basado en Gal enlazada en 6 y Man en 2. En *Eisenia bicyclis* la Gal estaba enlazada en 6, con sustituciones en C-4 y C-2<sup>32</sup>, a diferencia de la feofita *Laminaria japonica*<sup>21</sup> cuyas sustituciones están en C-3. En proporciones menores se ha encontrado Gal enlazada en C-3 y C-4 como en *Adenocystis utricularis*<sup>6</sup> y *Laminaria angustata*<sup>33,34</sup> y además en C-6 como en *Undaria pinnatifida*<sup>34</sup>.

EAH1 y EAH2 mostraron características similares en su estructura, con un core de residuos de manosa enlazados en 2, sustituciones por grupos sulfato en O-4, y en O-6 se encontraría sustituida por residuos de  $\beta$ -D-xilosa como grupos terminales no reductoras. En la fracción EAH1-1 aparecieron cantidades moderadas de galactosa enlazadas en 3 y de fucosa con uniones en C-2, C-3 y C-4 en proporciones chicas. En cambio, en las fracciones EAH1-1,5 y EAH2-0,5-EAH2-1,5 la fucosa estaba principalmente enlazada en C-2 y C-4. Cabe señalar que en los fucoidanos se ha encontrado que los residuos de fucosa estaban enlazados en 3 y 4 tal como se mostraron en las feofitas *Ecklonia kurome*<sup>35</sup>, *Ascophyllum nodosum*<sup>36,37</sup>, *Schoechospermum marginatum*<sup>38</sup>, *Fucus evanescens*<sup>39</sup>, *Fucus distichus*<sup>40</sup>, *Fucus serratus*<sup>41</sup>, *Sargassum trichophyllum*<sup>24</sup>, *Sargassum stenophyllum*<sup>21,24</sup> y *Laminaria japonica*<sup>21</sup>. Además, se han encontrado residuos de fucosa enlazados en 4 en *Sargassum pallidum*<sup>42</sup> y *Spatoglossum schröderi*<sup>43</sup> y fucosas enlazadas en 2 en *Ascophyllum nodosum*<sup>44</sup>, *Chordaria flagelliformis*<sup>45</sup> y también fucosa enlazada en 2, 3 y 4 en *Adenocystis utricularis*<sup>6</sup>. La fucosa puede presentar ramificaciones en C-2, C-3, C-4 o aparecer como grupos terminales no reductores<sup>30</sup>. Los análisis de HSQC corroboraron la presencia de unidades de fucosa enlazadas en 3 (99,8/5,01) y la unidad  $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-Fucp-(1 $\rightarrow$ 3)- que se observa en 97,7/5,22. La xilosa se encuentra como grupos terminales (103,6/4,34) y enlazada en 2 (101,3/4,48). La manosa también se encuentra enlazada en 2 (98,6/5,32).

Tal como se señaló en el capítulo anterior, las fracciones EAH3-EAH7 redisueltas en 0,5 M mostraron evidencias de un xilomanano, el cual se basaría en un *core* de  $\rightarrow 2$ )-Man-(1 $\rightarrow$ , con sustituciones por residuos de xilosa en O-6. Cabe señalar que la fracción EAH5-0,5 mostró este *core* con sustituciones por grupos sulfato en O-4 y en C-6 se encontró sustituido por residuos de xilosa como grupos terminales. Además, en la fracción EAH6-0,5 se encontró altas cantidades de fucosa enlazadas en 3. Los xilomananos usualmente se encuentran en las algas rojas, y a diferencia de aquellas encontradas en esta feofita, estas se basaban en un *core* de  $\rightarrow 3$ )- $\alpha$ -D-Man-(1 $\rightarrow$  con sustituciones en O-2 y O-6 por grupos sulfato tal como muestran las rodofitas *Nothogenia fastigiata*<sup>46,10</sup> o en el C-2 por cadenas de xilosa, tal como lo mostraron las rodofitas *Scinaia hatei*<sup>47</sup> y *Nemalion helmintoides*<sup>48</sup>. Por otro lado, se ha encontrado un xilomanano sulfatado diferente, cuyo *core* fue del tipo  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manano, y xilosa en el C-6 en las rodofitas *Chondrophycus papillosus* y *C. flagelliferus*, ambas pertenecientes al orden *Ceramiales*<sup>49</sup>.

El polisacárido encontrado en la feofita *Dictyota dichotoma* mostró ser altamente ramificado en concordancia con el estudio de la misma feofita realizado en Egipto en el año 1979<sup>50</sup>. A diferencia de nuestro estudio, en ese trabajo se encontraron residuos de ácido D-glucurónico, D-galactosa, D-manosa y D-xilosa enlazados en 4, mientras que los residuos de L-fucosa estaban enlazados en 2, sin indicar la unión entre estos azúcares.

## Conclusiones

En este capítulo se presentaron nuestros intentos en la determinación de la estructura de los fucoïdanos de la feofita *Dictyota dichotoma*, para lo cual se realizaron estudios de metilación, metilación de productos desulfatados y espectroscopía de resonancia magnética nuclear bidimensional tanto en las fracciones obtenidas a temperatura ambiente como a 70 °C.

Los resultados mostraron similitudes con respecto a otras especies algales pero también diferencias importantes. Las principales características encontradas en el fucoïdano de *D. dichotoma* fueron:

- a) Se observó un *core* basado en residuos de  $\rightarrow 2$ -Man-(1 $\rightarrow$  con sustituciones en O-3 o en O-6 y  $\rightarrow 6$ -Gal-(1 $\rightarrow$ , sulfatada en O-3.
- b) Altas proporciones de ramificaciones de  $\beta$ -D-xilosa.
- c) Los residuos de fucosa se encontraban enlazados en proporciones variables en C-2, C-3 y C-4, y en buena medida son terminales.

La presencia de los xilomananos en las fracciones obtenidas a 70 °C fue la principal distintiva en el sistema de polisacáridos, ya que estos se presentaban principalmente en las algas rojas.

Los resultados obtenidos mostraron claramente la necesidad de un estudio profundo de nuevos biopolímeros de fracciones extraídas de algas del género *Dictyota*, para lograr una mejor comprensión del tema y así poder llegar a conclusiones más definitivas sobre detalles estructurales.

## Referencias

1. Haworth W.N. "A new method of preparing alkylated sugars". *Journal of Chemistry Society*, 1915, **107**, 8-16.
2. Hakomori S.I. "A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide". *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 1964, **55**, 205-208.
3. Stevenson T.T. y Furneaux R.H. "Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae". *Carbohydrate Research*, 1991, **210**, 277-298.
4. Ciucanu I. y Kerek F. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates". *Carbohydrate Research*, 1984, **131**, 209-217.
5. Renard C.M.G.C., Champenois Y. y Thibault J. "Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of glasswort, *Salicornia ramosissima*". *Carbohydrate Polymers*, 1993, **22**, 239-245.
6. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 153-165.
7. Ponce N.M.A. "Estudio del sistema de polisacáridos de *Adenocystis utricularis*, un alga parda de las costas patagónicas argentinas de posible utilización farmacológica e industrial", Tesis Doctoral, Depto. Farmacia, FCyN., UNPSJB, 2006.
8. Kolender A.A. "Polisacáridos de *Nothogenia fastigiata* y *Georgiella confluens* (Rhodophyta). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas", Tesis Doctoral, Depto. Química Orgánica, FCEyN, UBA, 2003.
9. Cases M.R., Stortz C.A. y Cerezo A.S. "Structure of the "corallinans" sulphated xylogalactans from *Corallina officinalis*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 1994, **16**, 93-97.
10. Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "Water-soluble sulfated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and structures of the  $\alpha$ -D-(1 $\rightarrow$ 3)-linked mannans". *Carbohydrate Polymers*, 1987, **7**, 121-132.

11. Rees D.A. "A note in the characterization of carbohydrate sulphated by acid hydrolysis". *Biochemical Journal*, 1963, **88**, 343-345.
12. McKinell J.P. y Percival E. "Structural investigations of the water-soluble polysaccharide of the green seaweed *Enteromorpha compressa*". *Journal Chemical Society*, 1962, 3141-3148.
13. Nunn J.R. y Parolis H. "Sulphated polysaccharides of the *Grateloupiaceae* family. Part III. A polysaccharide from *Phyllymenia cornea*". *Carbohydrate Research*, 1969, **9**, 265-276.
14. Nunn J.R. y Parolis H. "Sulphated polysaccharides of the *Grateloupiaceae* family. Part IV. Methylation analysis of phyllymenan and desulphated phyllymenan". *Carbohydrate Research*, 1970, **14**, 145-150.
15. Usov A.I., Adamyants K.S., Miroshnikova L.I., Shaposhnikova A.A. y Kotechtkov N.K. "Solvolytic desulphation of sulphated carbohydrates". *Carbohydrate Research*, 1971, **18**, 336-338.
16. Kochetkov N.K., Usov A.I. y Adamyants K.S. "Monosaccharides. XXVI. Solvolytic desulfation of sulfated monosaccharides". *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1972, **42**, 1617-1622.
17. Stortz C.A. y Cerezo A.S. "Desulfation of the "soluble" carrageenans from *Iridaea undulosa* and methylation analysis of its partially desulfated  $\lambda$ -component". *Anales de la Asociación Química Argentina*, 1986, **74**, 353-360.
18. Navarro D.A., Flores M.L. y Stortz C.A. "Microwave-assisted desulfation of sulfated galactans". *Carbohydrate Polymers*, 2007, **69**, 742- 747.
19. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*". *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 2038-2047.
20. Vishchuk O.S., Ermakova S.P. y Zvyagintseva T.N. "Sulfated polysaccharides from seaweed *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: isolation, structural characteristics, and antitumor activity". *Carbohydrate Research*, 2011, **346**, 2769-2776.

21. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Zhang H. y Niu X. "Structures studies on a novel fucogalactan sulphate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, **47**, 126-131.
22. Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant`ev y Usov A.I. "A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*". *Carbohydrate Research*, 1999, **320**, 108-119.
23. Navarro D.A. "Desarrollo de métodos para el análisis de galactanos sulfatados. Aplicación al sistema de xilogalactanos del alga roja *Jania rubens* (Corallinales)", Tesis Doctoral, Depto. Química Orgánica, FCEyN, UBA, Argentina, 2008.
24. Lee J.-B., Takeshita A., Hayashi K. y Hayashi T. "Structures and activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*". *Carbohydrate Polymers*, 2011, **86**, 995-999.
25. Vinogradov E., Petersen B.O., Duus J. y Wasser S. "The structure of the glucuronoxilomannan produced by culinary-medicinal yellow brain mushroom (*Tremella mesenterica* Ritz.: Fr., Heterobasidiomycetes) grown as one cell biomass in submerged culture". *Carbohydrate Research*, 2004, **339**, 1483-1489.
26. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag.". *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 719-730.
27. Patankar M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L. y Clark G.F. "A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities". *The Journal of Biological Chemistry*, 1993, **268**, 21770-21776.
28. Nishino T., Nishioka C., Ura H. y Nagumo T. "Isolation and partial characterization of a novel aminosugar-containing fucan sulphate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan". *Carbohydrate Research*, 1994, **255**, 213-224.
29. Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S. y Yokokura T. "Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida". *Glyconjugate Journal*, 1999, **16**, 19-26.
30. Duarte M.E.R., Cardoso M.A., Nosedá M.D. y Cerezo A.S. "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **333**, 281-293.

31. Li B., Wei X.-J., Sun J.-L. y Xu S.-Y. "Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the Brown seaweed, *Hizikia fusiforme*". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 1135-1146.
32. Ermakova S., Men'shova R., Vishckuk O., Kim Sang-Min, Um Byung-Hun, Isakov V. y Zvyagintseva T. "Water-soluble polysaccharide from the brown alga *Eisenia bicyclis*: structural characteristics and antitumor activity". *Algal Research*, 2013, **2**, 51-58.
33. Nishino T., Nishioka C., Ura H. y Nagumo T. "Isolation and partial characterization of a novel aminosugar-containing fucan sulphate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan". *Carbohydrate Research*, 1994, **255**, 213-224.
34. Hemmingson J.A., Falshaw R., Furneaux R.H. y Thompson K. "Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta)". *Journal of Applied Phycology*, 2006, **18**, 185-193.
35. Nishino T. y Nagumo T. "Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulphate from the seaweed *Ecklonia kurome*". *Carbohydrate Research*, 1991, **211**, 77-90.
36. Chevolut L., Mulloy B., Ratiskol J., Foucault A. y Collic-Jouault S. "A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae". *Carbohydrate Research*, 2001, **330**, 529-535.
37. Marais M.-F. y Joseleau J.-P. "A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **336**, 155-159.
38. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B. y Ray B. "Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*". *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2474-2482.
39. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag.". *Carbohydrate Research*, 2002, **337**, 719-730.
40. Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L.". *Carbohydrate Research*, 2004, **339**, 511-517.

41. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L.". *Carbohydrate Research*, 2006, **341**, 238-245.
42. Ye H., Zhou C., Li W., Hu B., Wang X. y Zeng X. "Structural elucidation of polysaccharide fractions from brown seaweed *Sargassum pallidum*". *Carbohydrate Polymers*, 2013, 659-664.
43. Rocha H.A.O., Moraes F.A., Trindade E.S., Franco C.R.C., Torquato R.J.S., Veiga S.S., Valente A.P., Mourão P.A.S., Leite E.L., Nader H.B. y Dietrich C.P. "Structural and Hemostatic Activities of a Sulfated Galactofucan from the Brown Alga *Spatoglossum schroederi*. An Ideal Antithrombotic Agent?". *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**, 41278-41288.
44. Chevolot L., Foucault A., Chaubet F., Kervarec N., Siquin C., Fisher A.-M. y Boisson-Vidal C. "Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity". *Carbohydrate Research*, 1999, **319**, 154-165.
45. Bilan M.I., Vinogradova E.V., Tsvetkova A., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "A sulfated glucuronofucan containing both fucopyranose and fucopyranose residues from the brown alga *Chordaria flagelliformis*". *Carbohydrate Research*, 2008, **343**, 2605-2612.
46. Kolender A.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "The system of sulphated alpha-(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties". *Carbohydrate Research*, 1997, **304**, 53-60.
47. Mandal P., Pujol C.A., Carlucci M., Chattopadhyay K., Damonte E.B. y Ray B. "Antiherpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*". *Phytochemistry*, 2008, **69**, 2193-2199.
48. Perez M., Nosedá M., Pujol C.A., Carlucci M. y Matulewicz M. "Sulfated mannans from the red seaweed *Nemalion helmintoides* of the South Atlantic". *Phytochemistry*, 2009, **70**, 1062-1068.

49. Cardoso M., Nosedá M.D., Fujii M.T., Zibetti R.G.M. y Duarte M.E.R. "Sulfated xylomannans isolated from the red seaweed *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil". *Carbohydrate Research*, 2007, **342**, 2766-2775.
50. Magdel-Din Hussein M., Fouad S.T. y Abdel-Fattah A.F. "Structural features of a sulphated, fucose-containing polysaccharide from the brown *Dictyota dichotoma*". *Carbohydrate Research*, 1979, **72**, 177-181.

## **Capítulo 6**

---

# **Estudio de la actividad antiviral de los fucooidanos**

---

## 6.1. Introducción

Las algas pardas producen diferentes tipos de polisacáridos como alginatos, laminaranos y fucoidanos<sup>1</sup>. Los fucoidanos, que principalmente contienen L-fucosa y sulfato y menores cantidades de otros azúcares<sup>2-4</sup>, han recibido atención debido a sus diferentes actividades biológicas como anticoagulante<sup>5-10</sup>, antitrombótica<sup>11</sup>, antiinflamatoria<sup>12</sup>, antitumoral<sup>12-14</sup>, anticonceptiva<sup>15</sup>, y antiviral<sup>16-19</sup>. Cabe señalar en este último caso que la relación entre la estructura y la actividad antiviral no ha sido establecida<sup>20</sup>.

Con la finalidad de encontrar nuevos agentes alternativos para terapia y/o profilaxis antiviral a partir de polisacáridos de algas se ha estudiado la actividad de todo el sistema de los polisacáridos del alga parda cosmopolita *Dictyota dichotoma* como inhibidores de la replicación de los virus HHV1 (del inglés, *human herpes virus 1* también conocido por virus herpes simplex tipo 1) y CVB3 (del inglés, *Coxsackievirus B3*).

## 6.2. Actividad antiviral

### 6.2.1. Virus HHV1

La actividad antiviral se evaluó a través del método de reducción en la formación de placas. Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en 6 pocillos con 100 UFP de virus HHV1 cepa F por pocillo en presencia o ausencia de distintas concentraciones de polisacárido. Las placas fueron contadas después de dos días de incubación a 37 °C. La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) fue definida como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas del virus en un 50%. Además, se midió la viabilidad celular a través del método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). La concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) fue calculada como la concentración del compuesto requerida para reducir la viabilidad celular al 50%. El índice de selectividad (IS) es el cociente entre la CC<sub>50</sub> y la CI<sub>50</sub>.

Los análisis de la actividad antiherpética se realizaron sobre las fracciones tanto obtenidas a temperatura ambiente como a 70 °C tal como se mostraron en las Tablas 6.1 y 6.2, respectivamente. Además, se utilizó el compuesto ribavirin, con reconocidas propiedades antivirales, como una sustancia de referencia, obteniéndose para el mismo una  $CI_{50}$  de 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y una  $CC_{50}$  de 82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En la tabla 6.1 se pudo apreciar que la fracción EAR-0,5, que corresponde a un uronofucoidano (alta cantidad de ácidos urónicos y cantidades moderadas de grupos sulfato), presentó una alta actividad antiviral ( $CI_{50}$  12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y selectividad (IS de 100), así como las fracciones EAR-2 ( $CI_{50}$  7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y EAR-4 ( $CI_{50}$  15,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), las cuales presentaron características de galactofucanos y fucogalactanos, respectivamente (alta proporción de grupos sulfato y relativamente bajo peso molecular), mientras que las fracciones EAR-1 y EAR-1,5, mostraron bajas actividades antivirales ( $CI_{50}$  31,2 y 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente) e IS (10-16).

**Tabla 6.1. Actividad anti HHV1 y citotóxica de las fracciones del EAR de *D. dichotoma*.**

Fracción	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	IS
EAR-0,5	12,5	1250	100
EAR-1	31,2	312,5	10
EAR-1,5	62,5	>1000	>16
EAR-2	7,5	312,5	42
EAR-4	15,5	>1000	>65
Ribavirin	12	82	6,8

Los extractos obtenidos a 70 °C (Tabla 6.2) mostraron un poder inhibitorio viral menor que aquellos obtenidos a temperatura ambiente. Las fracciones EAH4-0,5, EAH9-0 y EAH2-1 mostraron valores aceptables ( $CI_{50}$  12,5-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), mientras que el resto de fracciones mostraron menor actividad antiviral y baja citotoxicidad.

**Tabla 6.2. Actividad antiviral anti HHV1 y citotóxica de las fracciones del EAH de *D. dichotoma*.**

<b>Fracción</b>	<b>CI<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>CC<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>IS</b>
<b>EAH1-0,5</b>	375	250	1
<b>EAH1-1</b>	50	500	10
<b>EAH1-1,5</b>	125	187	2
<b>EAH1-4</b>	93,7	>1000	>11
<b>EAH2-0,5</b>	375	750	2
<b>EAH2-1</b>	50	>1000	>20
<b>EAH2-2</b>	93,7	>1000	>11
<b>EAH3-1</b>	25	500	20
<b>EAH3-2</b>	93,7	500	5
<b>EAH4-0,5</b>	12,5	500	40
<b>EAH5-0,5</b>	100	500	5
<b>EAH6-0,5</b>	100	>1000	>10
<b>EAH8-0,5</b>	15,6	250	16
<b>EAH8-4</b>	375	500	1
<b>EAH9-0</b>	25	>1000	>40

Cabe señalar que las fracciones -0,5 presentaron proporciones similares de grupos iónicos que aquellas obtenidas a temperatura ambiente pero de menor peso molecular, lo que podría tener cierta influencia en los resultados de la actividad inhibitoria al HHV1.

Los altos valores de  $CC_{50}$  nos mostraron que no hubo signos de citotoxicidad tanto en las fracciones obtenidas a temperatura ambiente como a 70 °C.

### 6.2.2. Virus CVB3

En las mismas condiciones que se detallan en el apartado 6.2.1., se evaluó la actividad inhibitoria de los productos obtenidos tanto a temperatura ambiente como a 70 °C frente al CVB3 cepa Nancy (Tablas 6.3 y 6.4).

Los resultados de la actividad anti CVB3 de los extractos obtenidos a temperatura ambiente como a 70 °C ciertamente tuvieron un patrón diferente frente a aquellos obtenidos contra el HHV1. Los extractos EAR-1,5 y EAR-4 mostraron una actividad antiviral moderada ( $CI_{50}$  15,6  $\mu\text{g/mL}$ ) y una baja citotoxicidad ( $CC_{50}$  > 1000  $\mu\text{g/mL}$ ), siendo su índice de selectividad > 64, mientras que la fracción EAR-0,5 presentó una baja actividad antiviral ( $CI_{50}$  125  $\mu\text{g/mL}$ ) y el más bajo índice de selectividad (IS 10).

**Tabla 6.3. Actividad anti CVB3 y citotóxica de las fracciones del EAR de *D. dichotoma*.**

Fracción	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	IS
<b>EAR-0,5</b>	125	1250	10
<b>EAR-1</b>	15,6	312,5	20
<b>EAR-1,5</b>	15,6	>1000	>64
<b>EAR-2</b>	15,6	312,5	20
<b>EAR-4</b>	15,6	>1000	>64
<b>Ribavirin</b>	16	82	5,1

Con respecto a la actividad antiviral de las fracciones obtenidas a 70 °C (Tabla 6.4), la fracción EAH1-4 mostró la más alta actividad antiviral ( $CI_{50}$  12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) y selectividad (IS > 80), seguido de las fracciones EAH1-1, EAH2-0,5 y EAH6-0,5, las cuales mostraron

una actividad inhibitoria moderada ( $CI_{50}$  25-50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y un IS (20-30). Sin embargo, en el resto de las fracciones la actividad antiviral fue baja ( $CI_{50} > 50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y su IS (2-10). Cabe señalar que ninguna de las muestras presentó indicios de citotoxicidad.

**Tabla 6.4. Actividad anti CVB3 y citotóxica de las fracciones del EAH de *D. dichotoma*.**

Fracción	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	IS
EAH1-0,5	100	250	3
EAH1-1	25	500	20
EAH1-1,5	>100	187	>2
EAH1-4	12,5	>1000	>80
EAH2-0,5	25	750	30
EAH2-1	>100	>1000	>10
EAH2-2	>100	>1000	>10
EAH3-1	>100	500	>5
EAH3-2	>100	500	>5
EAH4-0,5	>100	500	>5
EAH5-0,5	50	500	10
EAH6-0,5	50	>1000	>20
EAH8-0,5	>100	250	>3
EAH8-4	>100	500	>5
EAH9-0	>100	>1000	>10

### 6.3. Discusión

Los análisis de la acción inhibitoria contra el virus HHV1, mostraron que a partir del extracto obtenido a temperatura ambiente, las fracciones EAR-0,5, EAR-2 y EAR-4 fueron las que poseen las más altas actividades antivirales ( $CI_{50}$  7,5-15,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y una baja citotoxicidad ( $CC_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Además, se observó que las fracciones obtenidas a 70 °C tienen menor poder inhibitorio que las obtenidas a temperatura ambiente, siendo las fracciones EAH4-0,5, EAH9-0 y EAH2-1 las que dan valores más aceptables, mientras que el resto de fracciones mostraron un índice de selectividad menor de 20. En este sentido cabe destacar los resultados reportados de la feofita *A. utricularis*, que también presentó una fracción de uronofucoidanos (-0,5) y, a diferencia de la nuestra, no mostró actividad inhibitoria hasta 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En cambio, la fracción compuesta de un galactofucano mostró la más alta actividad inhibitoria frente al mismo virus. Por otro lado, ellos también encontraron que las fracciones obtenidas a 70 °C extraídas con  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{HCl}$  tienen menor poder antiviral que aquellas obtenidas a temperatura ambiente<sup>4</sup>.

En la bibliografía han sido reportados varios fucoidanos con  $CI_{50}$  contra los virus HHV1 y HHV2 del orden de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o menos<sup>4,16,22</sup>. Sin embargo, otros autores<sup>21</sup> han reportado fucoidanos con  $CI_{50}$  de 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y los han considerado como agentes antivirales si el índice de selectividad estaba por encima de 10.

En cualquier caso, las fracciones EAR-0,5, EAR-2 y EAR-4 con índices de selectividad de 100, 42 y  $> 65$ , respectivamente, deben ser consideradas con una actividad inhibitoria moderada. Cabe señalar que los extractos crudos de *Dictyota dichotoma* obtenidos en Hong Kong exhibieron un  $CI_{50}$  de 24,3 y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las actividades contra el HHV1 y HHV2, respectivamente y un  $CC_{50}$  de 925  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>19</sup>, en concordancia con los valores que presentaron nuestras fracciones.

Por otro lado, el efecto inhibitorio contra CVB3 mostró un patrón diferente. Las fracciones EAR-1, EAR-1,5, EAR-2 y EAR-4, así como la fracción EAH1-4 presentaron las más altas actividades antivirales, ( $CI_{50}$  12,5-15,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); sin embargo, en el resto de las fracciones la actividad inhibitoria fue baja. Los mejores índices de selectividad en este virus fueron observados en las fracciones EAR-1,5, EAR-4 y EAH1-4 ( $IS > 64$ ).

Por lo tanto, la fracción EAR-4 es la de mayor valor como antiviral frente a estos virus. Esta fracción, así como EAH1-4 corresponde claramente a fucogalactanos sulfatados. En las otras fracciones, las cantidades altas de xilosa, así como relativamente bajos pesos moleculares en extractos altamente sulfatados pueden ser los responsables de su menor actividad inhibitoria.

Los estudios de la acción anti CVB en los polisacáridos de las algas pardas son sumamente escasos. Se ha reportado actividad antiviral en compuestos derivados de las feofitas *Laminaria japonica*<sup>23</sup> y *Undaria pinnatifida*<sup>24</sup>, las cuales mostraron actividad contra CVB moderada sin evidenciar signos de citotoxicidad (> 2000 µg/mL), siendo el IS en ambos casos de 20, valor similar al encontrado para algunas de las fracciones de *D. dichotoma*.

La actividad inhibitoria ha sido relacionada con una gran cantidad de factores, tales como aspectos relacionados a la cadena de carbohidratos (peso molecular, linealidad, flexibilidad, sitios hidrofóbicos), la presencia de grupos iónicos (carboxilato y/o sulfato) así como también el grado y distribución de los grupos sulfato<sup>25-27</sup>. Ha sido postulado que cuanto mayor es el peso molecular y grado de sulfatación del compuesto, mayor es la actividad antiviral<sup>28</sup>. Nuestros resultados nos permitieron confirmar esta afirmación ya que los fucogalactanos/galactofucanos sulfatados parecen ser los responsables del efecto inhibitorio en ambos virus estudiados<sup>4,29</sup>. La hidrofobicidad del grupo metilo en el C-6 de la fucosa puede ser responsable de este efecto<sup>17,18,25</sup>. Sin embargo, en el presente trabajo algunas fracciones que llevan altas cantidades de xilosa, manosa y ácidos urónicos parecen tener una actividad moderada contra el virus del HHV1, aunque baja contra el virus CVB3.

Los efectos de la actividad anti HHV1 de los xilomananos provenientes de las algas rojas, también han sido reportados en la rodófitas *Nothogenia fastigiata*<sup>30</sup>, *Nemalion helmintoides*<sup>31</sup> y *Scinaia hatei*<sup>32</sup>.

Cabe señalar que varios autores tras estudiar el mecanismo de acción indicaron que la actividad antiviral ocurre por bloque en la etapa de la adsorción/penetración del virus<sup>33-35</sup>, lo que probablemente ocurrió en nuestro caso ya que la actividad antiviral de los compuestos estudiados se realizó colocando el polisacárido en el medio antes de la adsorción del virus.

## Conclusiones

En este capítulo se realizó el estudio de la acción antiviral contra el virus HHV1 y el CVB3 en las diferentes fracciones obtenidas tanto a temperatura ambiente como a 70 °C, el cual permitió las siguientes conclusiones:

- En el ensayo contra el virus HHV1, la fracción compuesta por uronofucoidanos (EAR-0,5) mostró la más alta actividad antiviral, seguido de las fracciones EAR-2 y EAR-4; sin embargo, las fracciones obtenidas a 70 °C mostraron una menor actividad antiviral frente a aquellas obtenidas a temperatura ambiente, siendo sus actividades moderadas en las fracciones EAH2-0,5, EAH4-0,5 y EAH9-0 a pesar que en su composición son ricas en xilosa, manosa y ácidos urónicos.
- *D. dichotoma* es una de las pocas feofitas que presenta actividad moderada frente al virus CVB3, siendo las fracciones EAH1-4, EAR-1,5 y EAR-4, las que mejor índice de selectividad presentaron.
- La fracción EAR-4, caracterizada por contener una estructura de fucogalactano con alta cantidad de grupos sulfato, baja cantidad de ácidos urónicos y bajo peso molecular, mostró ser la mejor fracción frente a ambos virus.

Los altos valores obtenidos de  $CC_{50}$  obtenidos en todas las fracciones, nos mostraron que el fucoidano extraído de *D. dichotoma* no muestra signos de citotoxicidad.

## Bibliografía

1. Painter T.J. "Algal polysaccharides" in "The polysaccharides", Aspinal G.O. (ed.) London, Academic Press, 1983, pp. 195-285.
2. Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Kelly M., Sanderson C.J., Nifantiev N.E. y Usov A.I. "Further studies on the composition and structure of a fucoidan preparation from the brown alga *Saccharina latissima*". *Carbohydrate Research*, 2010, **345**, 2038-2047.
3. Duarte M.E.R., Cardoso M.A., Nosedá M.D. y Cerezo A.S. "Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2001, **333**, 281-293.
4. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Research*, 2003, **338**, 153-165.
5. Athurokala Y., Jung W.K., Vasanthan T. y Jeon Y.J. "An anticoagulative polysaccharide from an enzymatic hydrolysate of *Ecklonia cava*". *Carbohydrate polymers*, 2006, **66**, 184-191.
6. Chandía N.P. y Matsuhiro B. "Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, **42**, 235-240.
7. Chevotot L., Foucault A., Chaubet F., Kervarec N., Siquin C., Fisher A.-M. y Boisson-Vidal C. "Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity". *Carbohydrate Research*, 1999, **319**, 154-165.
8. Wang J., Zhang Q., Zhang Z., Zhang H. y Niu X. "Structures studies on a novel fucogalactan sulphate extracted from the brown seaweed *Laminaria japonica*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, **47**, 126-131.
9. Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H. y Yamada H. "Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*". *Carbohydrate Research*, 1991, **211**, 77-90.
10. Nishino T. y Nagumo T. "Anticoagulant and antithrombin activities of oversulfated fucans". *Carbohydrate Research*, 1992, **229**, 355-362.

11. Mauray S., Sternberg C., Theveniaux J., Millet J., Siquin C. y Tapon-Breaudiere J. "Venous antithrombotic and anticoagulant activities of a fucoidan fraction". *Thrombosis and Haemostasis*, 1995, **74**, 1280-1285.
12. Athrurukala Y., Ahn G.N., Jee Y.J., Kim G.Y., Kim S.H. y Ha J.H. "Antiproliferative activity of sulfated polysaccharide isolated from an enzymatic digest of *Ecklonia cava* on the U-937 cell line". *Journal of Applied Phycology*, 2009, **21**, 307-314.
13. Croci D.O., Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., Piccoli A., Totani L., Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Usov A.I., Grachev A.A., Morozevich G.E., Berman A.E., Sanderson C.J., Kelly M., Gregorio P.D., Rossi C., Tinari N., Lacobelli S., Rabinovich G.A. y Nifantiev N.E. "Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed". *PLoS ONE*, 2011, **6**, e17283.
14. Yang C., Chung D., Shin I.-S., Lee H., Kim J. y Lee Y. "Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*". *International Journal of Biological Macromolecules*, 2008, **43**, 433-437.
15. Mahony M.C., Oehninger S., Acosta A.A. y Hodgen G.D. "Fucoidin inhibits the zona pellucida-induce acrosome reaction in human spermatozoa". *Contraception*, 1991, **44**, 657-665.
16. Bandyopadhyay S.S., Heidary M., Ghosh T., Schnitzler P. y Ray B. "Structural features and *in vitro* antiviral activities of sulfated polysaccharides from *Sphacelaria indica*". *Phytochemistry*, 2011, **72**, 276-283.
17. Feldman S.C., Reynaldi S., Stortz C.A., Cerezo A.S. y Damonte E.B. "Antiviral properties of fucoidan fractions from *Leathesia difformis*". *Phytomedicine*, 1999, **6**, 335-340.
18. Venkateswaran P.S., Millman I. y Blumberg B.S. "Interaction of Fucoidan from *Pelvetia fastigiata* with Surface Antigens of Hepatitis B and Woodchuck Hepatitis Viruses". *Planta Medica*, 1989, **55**, 265-270.
19. Wang H., Vincent E. y Ang P.O. "Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds". *Journal of Zhejiang University Science B*, 2008, **9**, 969-976.

20. Ale M.T., Mikkelsen J.D. y Meyer A.S. "Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweed". *Marine Drugs*, 2011, **9**, 2106-2130.
21. Lee J.-B., Takeshita A., Hayashi K. y Hayashi T. "Structures and antiviral activities of polysaccharides from *Sargassum trichophyllum*". *Carbohydrate Research*, 2011, **86**, 995-999.
22. Wijesekara I., Pangestuti R. y Kim S. "Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae". *Carbohydrate Polymers*, 2011, **84**, 14-21.
23. Li F., Tian T.C. y Shi Y.C. "Study on anti virus effect of fucoidan in vitro". *Norman Bethune University of Medical Science*, 1995, **21**, 255-257.
24. Lee J.-B., Hayashi K., Hashimoto M., Nakano T. y Hayashi T. "Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu)". *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2004, **52**, 1091-1094.
25. Damonte E.B., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents". *Current Medicinal Chemistry*, 2004, **11**, 2399-2419.
26. Baba M., Schols D. y De Clercq E. "Novel sulfated polymers as highly potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus replication and giant cell formation". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, **34**, 134-138.
27. Pauwels R. y De Clercq E. "Development of vaginal microbicides for the prevention of heterosexual transmission of HIV". *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retroviral*, 1996, **11**, 211-221.
28. Schaeffer D.J. y Krylov V.S. "Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria". *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2000, **45**, 208-227.
29. Zhuang C., Itoh H., Mizuno T. y Ito H. "Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, umitoranoo (*Sargassum thunbergii*)". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 1995, **59**, 563-567.
30. Kolender A.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Matulewicz M.C. y Cerezo A.S. "The system of sulphated alpha-(1→3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpética and anticoagulant properties". *Carbohydrate Research*, 1997, **304**, 53-60.

31. Pérez M., Nosedá M.D., Pujol C.A., Carlucci M.J. y Matulewicz M.C. "Sulfated mannans from the red seaweed *Nemalion helminthoides* of the South Atlantic". *Phytochemistry*, 2009, **70**, 1062-1068.
32. Mandal P., Pujol C.A., Carlucci M.J., Chattopadhyay J., Damonte E.B. y Ray B. "Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*". *Phytochemistry*, 2008, **69**, 2193-2199.
33. Adhikari U., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B. y Ray B. "Structure and antiviral activity of sulphated fucans from *Stoechospermum marginatum*". *Phytochemistry*, 2006, **67**, 2474-2482.
34. Hoshino T., Hayashi I., Hayashi K., Hamada J., Lee J.B. y Sankawa U. "An antiviral active sulfated polysaccharide from *Sargassum hornery* (Turner) C. Agardh.". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 1998, **21**, 730-734.
35. Renn D.W. "Medical and biotechnological applications of marine macroalgal polysaccharide" in "Marine Biotechnology", Attaway D.H., Oskar R. (eds.), New York, Plenum Press, 1993, pp. 191-196.

# Capítulo 7

---

## Parte experimental

---

## 7.1. Consideraciones generales

Las muestras de algas fueron procesadas con un molinillo General Electric 5KH38PG-16 5E.

Para las extracciones y los fraccionamientos se utilizaron agitadores magnéticos FAC AM20, Thermolyne Nuova II y Cole-Parmer modelo 4658, y los agitadores mecánicos modelo Glas-Col (Terre Haute, USA) y Decalab, ambos con paletas de acero inoxidable.

Se utilizaron las centrífugas Sargent S-15700 trabajando a 3400 rpm y Sigma Laboratory Centrifuge 4K15C a 9000 rpm.

Las evaporaciones se realizaron en los evaporadores rotatorios Büchi 10566 y Heidolph W1 a presión reducida con temperaturas de baño de agua inferiores a 45 °C.

Las muestras en solución acuosa se llevaron a sequedad en liofilizadores Virtis 10-324 o Rificor L-T12, a presiones inferiores a 0,1 mmHg (100 mTorr), y a temperaturas del condensador cercanas a -45 °C.

Para la homogeneización de las soluciones y suspensiones de las muestras se utilizaron los vórtex Rotamixer (Hook & Tucker) y Fbr Decalab. En los casos necesarios las muestras se colocaron en un baño de sonicación Ultrasonic LC 30 H (Elma) o Testlab.

Las diálisis se realizaron a temperatura ambiente utilizando tubos de celulosa (Spectra Por o Sigma) seleccionando el diámetro según el volumen a dializar. El corte de peso molecular empleado fue el que se detalla en cada caso. Las diálisis se efectuaron 48 h en sistema abierto contra agua corriente y 24 h más en sistema cerrado contra agua destilada, en este último caso renovando el agua tres o cuatro veces.

Las determinaciones colorimétricas en el visible se llevaron a cabo en espectrofotómetros Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas de 1 cm de recorrido óptico.

Las cromatografías gas-líquido se realizaron en un cromatógrafo Hewlett Packard 5890, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un integrador HP3395. Se utilizó nitrógeno como gas portador, a una presión de cabeza de columna de 15 psi

y las corridas se efectuaron con una relación de split 90:1. Se utilizó una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de la fase líquida.

Los espectros de masa se realizaron en un sistema acoplado a un cromatógrafo gaseoso en un equipo Shimadzu GCMS-QP 5050 A, a un potencial de ionización de 70 eV y en condiciones similares a las de la cromatografía gaseosa usando detector FID, pero utilizando helio como gas portador.

## **7.2. Obtención del material de estudio**

### **7.2.1. Aislamiento de los polisacáridos**

El alga parda *Dictyota dichotoma* fue colectada en la Bahía Bustamante, provincia de Chubut, Argentina en Marzo de 2008.

Los ejemplares fueron lavados manualmente con agua de mar, y posteriormente secados bajo techo. Las algas secas fueron molidas en un molinillo de paletas utilizando un tamiz de malla 20 luego de una cuidadosa inspección manual para eliminar material defectuoso.

#### **7.2.1.1. Extracción de los polisacáridos**

##### **7.2.1.1.1 Extracción de los fucoidanos con HCl**

Trescientos g de alga seca y molida se trataron con etanol acuoso al 80% a temperatura ambiente durante 24 h, se centrifugó a 3400 rpm y se realizó una segunda extracción con etanol acuoso al 80% a 70 °C sobre una manta eléctrica. Los extractos etanólicos tanto a temperatura ambiente como a 70 °C fueron evaporados, e intercambiados con agua repetidas veces a fin de eliminar el etanol. Posteriormente, el residuo remante de la extracción alcohólica obtenida a temperatura fue extraído con una solución de ácido clorhídrico pH 2 a temperatura ambiente durante 7 h, se centrifugó a 3400 rpm y a continuación se agregó el mismo solvente pero a 70 °C. El volumen del extracto obtenido con ácido clorhídrico por centrifugación fue reducido en un evaporador rotatorio previa neutralización con bicarbonato de sodio y

posteriormente fue dializado utilizando una bolsa de poro 12000, liofilizados, y pesados. Dicho procedimiento se realizó 9 veces consecutivamente.

#### **7.2.1.1.2. Extracción de los fucoidanos con H<sub>2</sub>O**

Cincuenta g de alga seca y molida se trataron con etanol acuoso al 80% a temperatura ambiente y luego a 70 °C tal como previamente se describió. Posteriormente el residuo fue extraído con agua a temperatura ambiente durante 7 horas, se centrifugó a 3400 rpm, se dializó utilizando una bolsa de poro 12000, se liofilizó y pesó.

#### **7.2.1.1.3. Extracción de los alginatos**

A cincuenta g del residuo remanente de las nueve extracciones con HCl a 70 °C, se le agregó 300 mL de una solución de NaCO<sub>3</sub> al 3% a 50 °C durante 4 h por tres veces, se centrifugó a 3400 rpm, dializó utilizando una bolsa de poro 12000, liofilizó y pesó. La purificación se llevó a cabo agregando una solución del HCl 10% al extracto y colectando el precipitado por centrifugación. Luego al residuo obtenido se lo resuspendió en agua y se le agregó NaOH 10% para su redisolución. Posteriormente fue dializado y liofilizado.

### **7.2.2. Fraccionamiento del sistema de polisacáridos**

Para el fraccionamiento de los polisacáridos se aplicaron dos metodologías distintas: precipitación con una sal de amonio cuaternario y permeación por geles (Capítulo 4).

#### **7.2.2.1. Precipitación con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetrimide)**

A un gramo de cada uno de los extractos obtenidos a temperatura ambiente y cada uno de los extractos obtenidos a 70 °C se disolvió en 100 ml de agua destilada. Luego se agregó una solución al 10% de cetrimide (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, Sigma) agitando lentamente hasta que se observó ausencia de precipitación. En un paso posterior se centrifugó a 9000 rpm y la parte soluble se dializó en una bolsa de poro de 3000 y liofilizó, obteniéndose las fracciones con el acrónimo (-0). El

precipitado de las sales de cetrimide se suspendió en una solución de NaCl 0,5 M y se agitó durante toda la noche. Posteriormente el precipitado se centrifugó y el sobrenadante obtenido se extrajo con *n*-pentanol (3 x 30 ml), se dializó en una bolsa de poro de 3500, concentró y liofilizó. El mismo procedimiento se realizó tratando el precipitado con concentraciones crecientes de NaCl 1, 1,5, 2, 4 y en algunos casos 5 M.

#### **7.2.2.2. Cromatografía de permeación en geles**

Se prepararon columnas en escala preparativa utilizando Biogel P-30. El gel se preparó suspendiendo 2 g de Biogel P-30 en cloruro de sodio 0,1 M y se dejó hidratar durante una noche a temperatura ambiente.

Una vez producida la hidratación se desgasificó aplicando vacío y se incorporó en una columna de vidrio (1,2 x 33 cm). Se sembraron 10 mg de muestra disueltos en un pequeño volumen de NaCl 0,1 M y se eluyeron con el mismo solvente, recogándose fracciones de 400 µL mediante el uso de un colector automático. Sobre alícuotas de cada una de las fracciones obtenidas se determinó el contenido de azúcares totales por el método de fenol-ácido sulfúrico<sup>1</sup>.

### **7.3. Análisis de los extractos y fracciones: composición química cuantitativa**

#### **7.3.1. Determinación de azúcares totales**

Se empleó el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico según la técnica descrita por Dubois y colaboradores<sup>1</sup>.

##### Reactivos:

Solución de fenol al 5% (p/v). Esta solución es estable a temperatura ambiente durante varios meses conservada en frascos de color caramelo.

Ácido sulfúrico 98% grado analítico.

##### Procedimiento:

A 0,5 mL de solución contenido hasta 80 µg/mL de hidratos de carbono se le adicionaron 0,5 mL de fenol al 5% y se mezclaron. Luego se agregaron 2,5 mL de ácido

sulfúrico concentrado directamente sobre la superficie de la solución a fin de asegurar un calentamiento máximo y se dejaron reposar 10 min. Transcurrido este tiempo, los tubos se agitaron en un vórtex y se mantuvieron 20 min a temperatura ambiente. En forma paralela se preparó un blanco con agua destilada. Finalmente se leyó la absorbancia del color desarrollado a 482 nm (máximo de absorción para fucosa), y el contenido de hidratos de carbono totales se cuantificó por referencia a curvas patrón de fucosa. El resultado se expresó como porcentaje de azúcar anhidro ( $\times 162/180$ ).

### **7.3.2. Determinación de ácidos urónicos**

Se realizó siguiendo la modificación de Filisetti-Cozzi y Carpita<sup>2</sup> del método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen<sup>3</sup>.

#### Reactivos:

Solución A: ácido sulfámico/sulfamato de potasio 4 M (pH 1,6)

Solución B: tetraborato de sodio 0,0125 M en ácido sulfúrico concentrado, grado analítico.

Solución C: *m*-hidroxidifenilo (0,15%) en hidróxido de sodio acuoso al 0,5%.

#### Procedimiento:

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra de polisacárido conteniendo hasta 200 nmoles de ácido hexurónico, se diluyeron con agua hasta 0,5 mL. Posteriormente se les agregaron 40  $\mu$ L de la solución A a cada tubo y se agitaron en un vórtex. Sobre los tubos colocados en baño de hielo se adicionaron 2,5 mL de la Solución B. Nuevamente se agitaron los tubos, y se llevaron a un baño de agua a 100 °C durante 30 min. Luego se colocaron en un baño de hielo para alcanzar la temperatura ambiente rápidamente y se les agregaron 80  $\mu$ L de la Solución C. Finalmente se agitaron los tubos, se dejaron reposar entre 5 y 10 minutos y se leyeron las absorbancias a 525 nm. Esta mezcla permanece estable por 1 h. Se preparó un blanco con agua destilada y se utilizó D-glucuronolactona de concentración 80  $\mu$ g/mL como patrón. En los cálculos se consideró que la absorbancia producida por reacción con azúcares neutros fue 1/40 de la que produce el ácido glucurónico.

### **7.3.3. Determinación cuantitativa de proteínas totales**

Se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Lowry y colaboradores<sup>4</sup>.

#### Reactivos:

Solución A: solución de carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0,1 M.

Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5% en solución de tartrato de sodio y potasio al 1%.

Solución C: preparada mezclando 50 mL de la Solución A y 1 mL de la Solución B. Esta mezcla debe ser usada dentro de las 24 h luego de su preparación.

Solución D: dilución al medio de un volumen de reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck). Esta solución debe prepararse inmediatamente antes de ser usada, y su absorbancia contra agua destilada debe ser inferior a 0,040.

#### Procedimiento:

Se tomaron alícuotas de la solución de la muestra conteniendo hasta 500 µg de proteínas por mL y se llevaron a un volumen final de 0,4 mL con agua destilada. Luego se agregaron a cada tubo 2,5 mL de la Solución C. Se mezclaron y se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 10 min. Se agregaron 0,2 ml de la Solución D rápidamente y con agitación dentro de los 2 s. Un blanco de agua destilada se preparó en forma paralela. Las muestras se mantuvieron durante 30 minutos en reposo, y luego de ese tiempo se leyeron las absorbancias a 600 nm. Para determinar la cantidad de proteínas presentes en las muestras se preparó una curva patrón a partir de solución de albúmina de suero bovino de 500 µg/mL.

### **7.3.4. Determinación del contenido de sulfato**

Se utilizaron el método turbidimétrico de Dodgson y Price<sup>5,6</sup> y la cromatografía de intercambio iónico con detector conductimétrico<sup>7</sup>.

#### **7.3.4.1. Método turbidimétrico**

##### Reactivos:

Reactivo de cloruro de bario-gelatina: se preparó por disolución de 200 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfatos) en 40 mL de agua destilada (o desionizada, grado HPLC), a 60-

70 °C. Esta solución se mantuvo en heladera durante no menos de 6 h, luego se disolvieron en la misma, 200 mg de cloruro de bario (grado analítico) y se dejó en heladera por 3 h o más. Este reactivo es estable por aproximadamente 7 días si se conserva a menos de 4 °C.

Solución de ácido tricloroacético (TCA) 3% (p/v): se preparó por disolución de 15 g del ácido en agua destilada, llevando a un volumen final de 500 mL. Esta solución es estable conservada en heladera.

#### Procedimiento:

Se colocaron hasta 3 mg de las muestras conteniendo entre 20 y 200  $\mu\text{g}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$ /0,2 mL de solución final, en viales provistos de tapas de teflón. Se les agregó 1-1,5 mL de HCl 1 M y se hidrolizaron en estufa a 110 °C durante 4 h. Una vez enfriadas, se tomaron alícuotas del hidrolizado desde 100 a 400  $\mu\text{L}$  y se llevaron a un volumen final de 400  $\mu\text{L}$  con ácido clorhídrico 1 M. A cada una de las muestras se les adicionó 2,8 mL de la solución de TCA y se agitaron. Luego se les agregó 800  $\mu\text{L}$  del reactivo de cloruro de bario-gelatina y tras agitar nuevamente se dejaron en reposo por 20 min. Posteriormente se procedió a leer las absorbancias (turbidez) a 360 nm en menos de una hora. Como solución patrón se utilizó una solución preparada disolviendo sulfato de sodio anhidro en HCl 1 M de manera de lograr una concentración equivalente a 400  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de  $\text{SO}_4^{2-}$ . La medición debe ser realizada dentro de la primera hora, debido a que luego el sulfato de bario tiende a precipitar.

### **7.3.4.2. Cromatografía iónica con detector conductimétrico**

#### Procedimiento:

Las muestras (aprox. 1 mg) se disolvieron en ácido trifluoroacético 2 M (1 mL) y luego se hidrolizaron en vial cerrado a 110-120 °C durante 2-4 h. Una vez enfriadas, se llevaron a sequedad bajo corriente de aire y se redisolieron en 5 mL de agua ultra pura. La determinación de sulfato se realizó en un cromatógrafo iónico Dionex DX-100, equipado con una columna AS4A y un detector conductimétrico. La elución se realizó con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,8 mM y  $\text{NaHCO}_3$  1,7 mM, con un flujo de 2 mL/min. Este trabajo fue realizado como servicio por el INQUIMAE.

### 7.3.5. Determinación del peso molecular promedio

Se efectuó mediante determinación de grupos reductores siguiendo la técnica de Park y Johnson<sup>8</sup>.

#### Reactivos:

Solución A: ferricianuro de potasio (500 mg/L). Está solución debe ser conservada en botella de color caramelo.

Solución B: cianuro de potasio (0,65 g/L) en solución de carbonato de sodio (5,3 g/L).

Solución C: 1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) disueltos en un litro de ácido sulfúrico 0,025 M. Está solución debe ser filtrada luego de preparada.

#### Procedimiento:

Se tomaron alícuotas de las soluciones de las muestras conteniendo hasta 30 nmoles de azúcar reductor, y se llevaron a un volumen final de 0,5 mL. Luego se agregaron 0,5 mL de la solución A y 0,5 mL de la solución B a cada uno de los tubos y se agitaron. Los tubos se taparon con bolitas de vidrio y se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 15 min. Se enfriaron y se adicionaron 2,5 mL de la solución C. Posteriormente se leyeron las absorbancias del color desarrollado a 690 nm y la cantidad de grupos reductores se determinó por referencia a curvas patrón. Se utilizó un blanco de agua destilada preparado de igual forma. Para la construcción de la curva patrón se efectuaron diluciones de soluciones madre de galactosa (hasta 30 nmoles de azúcar reductor/0,5 mL). Para calcular el peso molecular (promedio numérico) se utilizó la siguiente ecuación:

$$\overline{PM} = \frac{m \cdot \%HC \cdot p \cdot V_{alic} \cdot 10}{A \cdot V_t} \cdot P_{Manh} \cdot \frac{180}{162}$$

#### **Donde:**

- **m**: masa del polisacárido en mg.
- **%HC**: porcentaje de hidratos de carbono totales del polisacárido.
- **p**: pendiente de la curva de absorbancia vs concentración del azúcar.

- $V_{\text{alíc}}$ : volumen de la alícuota de la solución del polisacárido en mL.
- $V_t$ : volumen total de la solución (0,5 mL).
- $PM_{\text{anh}}$ : peso molecular promedio de la unidad monosacáridica.
- **180/162**: factor que corrige el hecho que el peso molecular de la unidad monosacáridica en el polisacárido tiene 18 unidades de masa menos que el azúcar empleando como estándar.

### **7.3.6. Determinación de azúcares componentes**

Se realizó tras analizar por cromatografía gaseosa los derivados de los monosacáridos provenientes de hidrólisis ácida de los polisacáridos.

#### **7.3.6.1. Hidrólisis ácida**

Se colocaron en viales provistos de cierre de teflón 1 a 3 mg de muestra, y luego se adicionó 1 mL de TFA 2 M, y se hidrolizaron en la estufa a 121 °C durante 90 min. Luego fueron llevados a sequedad bajo corriente de aire o bien a presión reducida y a 35 °C (especialmente en el caso de derivados metilados, para evitar volatilizaciones). Posteriormente los hidrolizados fueron disueltos en agua y nuevamente evaporados; este tratamiento se realizó las veces necesarias hasta eliminar totalmente el ácido. Las muestras fueron colocadas en un desecador al vacío durante una noche.

#### **7.3.6.2. Preparación de los aldonitrilos peracetilados<sup>9,10</sup>**

A las muestras secas (provenientes de las hidrólisis de los extractos etanólicos) contenidas en los viales y/o dedales, se les adicionaron 10 mg de clorhidrato de hidroxilamina y 0,5 mL de piridina, se cerraron y se calentaron en estufa a 85 °C durante 30 min. Se dejaron enfriar y posteriormente se les agregaron 0,5 mL de anhídrido acético. Luego se colocaron en estufa a la misma temperatura por 30 min más. Una vez que llegaron a temperatura ambiente, las soluciones se extrajeron con 1 mL de la mezcla cloroformo-agua (1:1). Los extractos clorofórmicos recuperados se lavaron tres veces con 1 mL de solución saturada de bicarbonato de sodio y dos veces con 1 mL de agua destilada. Finalmente los extractos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a sequedad. El residuo obtenido se disolvió con 20 µL de

cloroformo inmediatamente antes de ser inyectado en el cromatógrafo gaseoso (Sección 7.4).

### **7.3.6.3. Preparación de los alditos peracetilados<sup>11,12</sup>**

A las muestras secas (provenientes de las hidrólisis) contenidas en los viales, se les agregaron 0,5 mL de hidróxido de amonio 1 M y se redujeron con borohidruro de sodio (5 mg) durante al menos 2 h a temperatura ambiente. En un paso posterior se adicionaron gotas de ácido acético diluido para destruir el exceso de agente reductor, hasta que cesó la efervescencia, y se descationizaron por agregado de resina Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Las muestras se filtraron y evaporaron a sequedad. El ácido bórico generado se eliminó como borato de metilo, mediante 5 agregados de 0,5 mL de metanol y evaporación a sequedad en cada oportunidad. Se dejaron en desecador al vacío durante una noche y la mezcla de alditos obtenida se acetiló con 1 mL de anhídrido acético-piridina (1:1), calentando durante 45 min a 100 °C. La solución resultante se enfrió y se extrajo con 1,5 mL de cloroformo-agua (1:1). La fase acuosa se recuperó y se extrajo nuevamente con una mezcla de iguales características.

Los extractos clorofórmicos se reunieron y recibieron el mismo tratamiento descrito más arriba para la preparación de aldononitrilos peracetilados, para luego ser inyectados en el cromatógrafo (Sección 7.4).

### **7.3.7. Métodos de reducción del grupo carboxilo**

#### **7.3.7.1. Reducción con carbodiimida<sup>13</sup>**

A una solución del polisacárido ácido en metanol-agua (1:1) conteniendo 100 µeq de ácido carboxílico, se le agregó 1 mmol de EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida]. La mezcla de reacción se agitó durante 2 h manteniendo el pH entre 4,7 y 5,0 mediante el agregado de ácido clorhídrico 0,04 M. Posteriormente se agregaron 40 mg de borodeuteriuro de sodio. El ascenso rápido de pH debido a la destrucción del NaBD<sub>4</sub> en el medio ácido se contrarrestó con ácido clorhídrico 0,5 M, manteniéndose entre 7 y 7,5 y se continuó la agitación por 3 h más, se dializó con una bolsa de poro de 3500, liofilizó y se derivatizaron en alditos peracetilados y se analizaron por CGL.

### **7.3.7.2. Método del “metanol mágico”<sup>14</sup>**

Se efectuó una modificación de la técnica original: porciones de 20 mg de muestra fueron agitadas en agitador magnético con 20 mL de MeOH-CHCl<sub>3</sub>-HCl concentrado (10:1:1) por siete días a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, los polisacáridos se colectaron por centrifugación, se lavaron con etanol (2x20 mL) y fueron suspendidos en buffer imidazol 1 M pH 7 (2 mL). Posteriormente la suspensión fue enfriada en un baño de hielo, se añadieron 400 mg de borohidruro de sodio, y la mezcla de reacción se agitó durante 1,5 h a 0 °C. Se agregó cuidadosamente 1 mL de ácido acético glacial. En un paso posterior, la muestra se descationizó por agregado de resina Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Por último se realizaron 5 agregados de 0,5 mL de metanol para eliminar el ácido bórico como borato de metilo. El polisacárido reducido se hidrolizó con ácido TFA 2 M y los monosacáridos resultantes se convirtieron en alditoles peracetilados y se analizaron por CGL.

### **7.3.8. Estudios de metilación**

La metilación de los polisacáridos fue realizada sobre sus sales de trietilamonio.

#### **7.3.8.1. Obtención de las sales de trietilamonio del polisacárido**

Para preparar dichas sales se disolvieron 5 mg de cada muestra en 0,5 mL de agua y se sembraron en una columna que contenía una resina catiónica fuerte Amberlite IR-120 previamente equilibrada con clorhidrato de trietilamonio al 5% y lavada con abundante agua hasta reacción negativa de cloruros en las aguas de lavado. Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se recuperaron por elución con agua, se liofilizaron y posteriormente se procedió a la metilación utilizando los Métodos 1, 2 ó 3.

#### **7.3.8.2. Estudios de metilación**

**Método 1:** Esta técnica fue descrita por Stevenson y Furneaux<sup>15</sup> con la modificación realizada por Ciucanu y Kerek<sup>16</sup>, variando las cantidades de reactivos y los tiempos de reacción sobre la fracción EAR-4. A la sal de Et<sub>3</sub>NH<sup>+</sup> del polisacárido se disolvió en 1 mL

de DMSO anhidro, agitando hasta disolución total y calentando a 40 °C. Una vez alcanzada la temperatura ambiente se agregaron 100 mg de hidróxido de sodio pulverizados, y se agitó la mezcla durante 30 min. Posteriormente se agregaron 0,5 mL de yoduro de metilo y se agitó durante 30 min más. Para finalizar la reacción se agregaron 2 mL de agua. Los productos permetilados se dializaron (bolsa de poro 3500) durante 48 h contra agua corriente y 24 h más contra agua destilada y se liofilizó.

**Método 2:** Esta técnica fue descrita por Renard y colaboradores<sup>17</sup>.

Las muestras (5 mg) disueltas en agua se sembraron en una columna que contenía Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>) y los polisacáridos se recuperaron por elución con agua y posterior liofilización. Luego se disolvieron en 2 ml de DMSO y se metilaron con 1 mL de yoduro de sodio en presencia una punta de espátula de NaOH. Finalmente sobre baño de hielo se agregaron unas gotas de agua destilada y se procedió a dializar los polisacáridos metilados en una bolsa de poro 3500.

Los polisacáridos permetilados obtenidos se hidrolizaron y derivatizaron a los alditoles peracetilados correspondientes, y se analizaron por CGL-EM.

**Método 3:** Está técnica fue descrita por Ponce y colaboradores<sup>18</sup>.

Las muestras (5 mg) se disolvieron como sus sales de trietilamonio en 2 mL de DMSO y se calentó 50 °C hasta disolución completa. Después de enfriar se agregaron 100 mg de hidróxido de sodio pulverizado, y se agitó durante 15 min. A continuación se añadieron 0,5 mL de yoduro de metilo y se agitó por 30 min. Luego se agitó por un período igual, pero a 50 °C y se dejó enfriar. Este procedimiento se repitió dos veces más. Finalmente se llevó a neutralidad con ácido acético, se burbujeó nitrógeno a través de una aguja, se dializó en una bolsa de poro de 3500 y se procedió a su liofilización.

### **7.3.9. Estudios de desulfatación**

La desulfatación de las fracciones obtenidas se llevó a cabo a través del método de Navarro y colaboradores<sup>19</sup>.

### **7.3.9.1. Obtención de la sal de piridinio del polisacárido**

Entre 20 y 50 mg de polisacárido se disolvieron en 5 mL de agua destilada y se pasaron a través de una columna ácida Amberlite IR-120 que había sido previamente tratada para tener piridinio como contraión. La sal de piridinio del polisacárido eluída con agua se recuperó por liofilización.

### **7.3.9.2. Reacción de desulfatación solvolítica asistida por microondas**

Entre 20 y 50 mg de la sal de piridinio del polisacárido sulfatado fueron disueltas en 9,8 mL de DMSO y 0,2 mL de piridina anhidra. La mezcla fue tratada en un horno a microondas SHARP mediante 6 pulsos de 10 s cada uno, enfriando en baño de hielo, tras cada tratamiento hasta una temperatura menor a 60 °C utilizando recipientes de teflón especialmente diseñados para tal propósito<sup>7</sup>. Finalmente la solución tratada se dividió en dos porciones (7 y 3 ml). La porción mayoritaria se dializó en bolsa de poro 3500 durante 48 h en sistema abierto y 24 h más en sistema cerrado, para luego realizar las determinaciones analíticas. El resto de la solución se utilizó para realizar la metilación *in situ*. Esta fue realizada sobre la solución del polisacárido disuelto en DMSO-piridina proveniente de la desulfatación asistida por microonda<sup>16</sup>. Cabe señalar que durante la metilación la solución toma un color rojo-marrón característico del yodo en solución.

## **7.4. Cromatografía Gas-Líquido**

Las características del cromatógrafo utilizado se describen en la Sección 7.1.

En el caso de los azúcares provenientes de los extractos y las fracciones obtenidas a partir de ellos (monosacáridos derivatizados como aldononitrilos o como alditoles peracetilados) se realizaron en una corrida isotérmica a 220 °C y la temperatura del inyector y detector fue de 235 °C.

Para el análisis de los azúcares metilados se utilizó un programa de temperaturas de 160 °C→210 °C, a 2 °C/min y luego 210 °C→240 °C, a 5 °C/min. En este caso la temperatura del inyector y detector se mantuvieron a 245 °C<sup>11</sup>.

## **7.5. Estudios de resonancia magnética nuclear**

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker AM 500 utilizando tubos de 5 mm a temperatura ambiente.

Los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  y HSQC se obtuvieron en un equipo Bruker Avance II 500, a temperatura ambiente, en tubos de 5 mm de diámetro conteniendo 20 mg de muestra disueltos en 500  $\mu\text{L}$  de agua deuterada. Los parámetros utilizados para RMN de  $^{13}\text{C}$  fueron los siguientes: tiempo de relajación máximo, ángulo de pulso de  $90^\circ$  y unos 40000 pulsos, sin espacio entre pulsos. Para realizar los análisis de HSQC se realizaron en el mismo espectrofotómetro a 500,13 ( $^1\text{H}$ ) y 125,77 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz, a temperatura ambiente utilizando las secuencias de pulsos standard de Bruker. Se añadió acetona como estándar interno (tomando como referencia  $\text{Me}_4\text{Si}$  y calibrado el grupo metilo de la acetona en 31,1 ppm para  $^{13}\text{C}$  y 2,22 ppm para  $^1\text{H}$ ).

## **7.6. Estudios de actividad antiviral**

### **7.6.1. Ensayo de actividad antiviral ( $\text{IC}_{50}$ )**

Se midió la actividad antiviral de los extractos provenientes de la extracción con HCl a temperatura ambiente como a  $70^\circ\text{C}$  contra los virus HHV1 (*Human Herpesvirus 1*, cepa F) y CVB3 (*Coxsackievirus B3*, cepa Nancy).

Se emplearon células Vero, línea derivada del riñón de mono verde africano crecidas en un medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 5% de suero bovino.

La actividad antiviral de los polisacáridos se evaluó mediante un ensayo de reducción del número de placas virales. Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microcapas de 6 pocillos con fondo plano con aproximadamente 100 unidades formadoras de placa por pocillo (UFP/pocillo) del virus correspondiente, en ausencia (control) o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos a ensayar por duplicado. Las placas fueron contadas después de 2 días a  $37^\circ\text{C}$ . Se usó ribaravin como una muestra control. Se calculó la concentración inhibitoria 50 ( $\text{CI}_{50}$ ) como la concentración del compuesto requerida para reducir el número de placas virales en un 50%.

### **7.6.2. Determinación de la concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>)**

El ensayo se realizó sobre monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 6 pocillos con fondo plano. Se prepararon soluciones acuosas de 2 mg/mL de las fracciones obtenidas extraídas con HCl diluido tanto a temperatura ambiente como a 70 °C. Se incubaron las células durante 48 h a 37 °C en medio de cultivo MEM con 1,5% de suero bovino, conteniendo las distintas muestras de polisacáridos. La citotoxicidad se evaluó por el método colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)<sup>20</sup> midiendo la absorbancia a 595 nm. La concentración citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) se calculó como la concentración del compuesto requerida para reducir la viabilidad celular en un 50%.

## Bibliografía

1. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A y Smith F. "Colorimetric method of determination of sugars and related substances". *Analytical Chemistry*, 1956, **28**, 350-356.
2. Filisetti-Cozzi T.M. y Carpita N.C. "Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars". *Analytical Biochemistry*, 1991, **197**, 157-162.
3. Blumenkrantz N. y Asboe-Hansen G. "New method for quantitative determination of uronic acids". *Analytical Biochemistry*, 1973, **54**, 484-489.
4. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J. "Protein measurements with the Folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry*, 1951, **193**, 265-275.
5. Dodgson K.S. "Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters". *Biochemical Journal*, 1961, **78**, 312-319.
6. Dodgson K.S. y Price R.G. "A note on the determination of ester sulphate content of sulphated polysaccharides". *Biochemical Journal*, 1962, **84**, 106-110.
7. Navarro D.A. "Desarrollo de métodos para el análisis de galactanos sulfatados. Aplicación al sistema de xilogalactanos del alga roja *Jania rubens* (Corallinales)", Tesis Doctoral, Depto. Química Orgánica, FCEyN, UBA, Argentina, 2008.
8. Park J.T. y Johnson M.J. "A submicrodetermination of glucose". *Journal of Biological Chemistry*, 1949, **181**, 149-151.
9. Seymour F.R., Chen E.C.M. y Bishop S.H. "Identification of aldoses by use of their peracetylated aldonitrile derivatives: a G.L.C.-M.S. approach". *Carbohydrate Research*, 1979, **73**, 19-45.
10. Turner S.H. y Cherniak R. "Total characterization of polysaccharides by gas-liquid chromatography". *Carbohydrate Research*, 1981, **95**, 137-144.
11. Shea E.M. y Carpita N.C. "Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns". *Journal of Chromatography*, 1988, **445**, 424-428.
12. Albersheim P., Nevins D.J., English P.D. y Karr A. "A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography". *Carbohydrate Research*, 1967, **5**, 340-345.

13. Taylor R.L. y Conrad H.E. "Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups". *Biochemistry*, 1972, **11**, 1383-1388.
14. Usov A.I., Bilan M.I. y Klochkova N.C. "Polysaccharides of algae. 48. Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rodophyta, Corallinaceae)". *Botanica Marina*, 1995, **38**, 43-51.
15. Stevenson T.T. y Furneaux R.H. "Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae". *Carbohydrate Research*, 1991, **210**, 277-298.
16. Ciucanu I. y kerek F. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates". *Carbohydrate Research*, 1984, **131**, 209-217.
17. Renard C.M.G.C., Champenois Y. y Thibault J. "Characterisation of the extractable pectins and hemicelluloses of the cell wall of glasswort, *Salicornia ramosissima*". *Carbohydrate Polymers*, 1993, **22**, 239-245.
18. Ponce N.M.A., Pujol C.A., Damonte E.B., Flores M.L. y Stortz C.A. "Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies". *Carbohydrate Reserch*, 2003, **338**, 153-165.
19. Navarro D.A., Flores M.L. y Stortz C.A. "Microwave-assisted desulfation of sulfated galactans". *Carbohydrate Polymers*, 2007, **69**, 742- 747.
20. Denizot F. y Lang R. "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure givin improved sensitivity andreliability". *Journal of Immunological Methods*, 1986, **89**, 271-277.

**Parte de esta Tesis Doctoral dio lugar al siguiente trabajo:**

“The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical characterization and antiviral activity”, M. Rabanal, N. M. A. Ponce, D. A. Navarro, R. M. Gómez & C. A. Stortz, *Carbohydr. Polymers*, **2014**, *101*, 804–811.