

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS
NO GALACTANOS DE ALGAS MARINAS Y FACTORES QUE
INFLUENCIAN SU COMPOSICIÓN.**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

ENRIQUE HERNÁNDEZ GARIBAY

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA MÉXICO. OCTUBRE DE 2011.

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS NO GALACTANOS DE ALGAS MARINAS Y FACTORES QUE INFLUENCIAN SU COMPOSICIÓN

Las algas marinas son una fuente importante de polisacáridos iónicos. A diferencia de lo que ocurre en plantas terrestres, en las algas marinas hay una mayor proporción de polisacáridos iónicos respecto a los neutros. En particular, los polisacáridos sulfatados (PS), ausentes en plantas terrestres, son los de más amplia distribución entre las diferentes divisiones de macroalgas. Dentro de los polisacáridos sulfatados y de acuerdo a los azúcares que lo constituyen; cabe destacar la presencia de dos grupos principales; aquellos formados por la galactosa, llamados galactanos sulfatados (PGS), como en el caso de agar y carragenanos de algas rojas y en algunos grupos de algas verdes. En el otro grupo son PS, donde el azúcar principal, es diferente a la galactosa (PSNG); estos últimos, son aquellos formados por deoxiazúcares sulfatados, tales como la fucosa (Fucoïdanes) que ocurre en algas pardas y la ramnosa (Ulvanes) que se presenta en algas verdes (Ulvales). En este estudio, se evaluaron especies de macroalgas pardas y verdes del Pacífico templado mexicano con el propósito de conocer su contenido de polisacáridos sulfatados no galactanos (PSNG), así como sus características químicas. En una primera etapa, se evaluaron los métodos de extracción en función de los rendimientos obtenidos y contenido de grupos sulfato. El alga parda *Silvetia compressa* se extrajo en diferentes medios acuosos (agua, HCl, NaOH/CaCl₂ y CaCl₂) a diferentes temperaturas (20, 60 y 80°C). El resultado obtenido, mostró que las condiciones de extracción influyen en el rendimiento y características del producto. Los mejores rendimientos en general se obtuvieron a través de una extracción ácida (de 3.15 a 15.49% en peso seco del alga); sin embargo, el mayor contenido de sulfatos correspondió a las extracciones con CaCl₂ (18.9 a 28.3%), que por otra parte, a este medio correspondieron los menores rendimientos. Para todos los casos probados se observó una correlación positiva entre el rendimiento y la temperatura de extracción. Sin embargo, el incremento observado en el contenido de sulfatos no fue proporcional al incremento obtenido en el rendimiento, esto sugiere que temperaturas mayores, incrementan la solubilidad de materiales de composición diferente a los polisacáridos sulfatados (ej. azúcares neutros). En función de los rendimientos, contenido de sulfatos y características de solubilidad de los extractos obtenidos, se adoptó como condiciones de extracción el medio ácido a 60°C para los estudios siguientes.

En la segunda etapa, se realizó un monitoreo en diferentes especies de macroalgas características de las costas de Baja California. Se colectaron 12 especies de macroalgas, de las cuales 8 fueron algas pardas: *Silvetia compressa*, *Hesperophycus californicus*, *Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Halidrys dioica*, *Egregia menziesii*,

Padina durvillaei y *Sargassum johnstonii*, además de 4 especies de algas verdes: *Codium fragile*, *Ulva lactuca*, *Ulva nematoidea* y *Ulva clathrata*; se cuantificó el contenido y composición de los PS presentes. Los resultados muestran que el contenido de PS varía entre especies y entre las divisiones algales. Mayores rendimientos (10 a 30% en base seca) de polisacáridos sulfatados y con mayor contenido de grupos hemiéster sulfato (7 a 32%) se obtuvieron para las algas verdes; para las algas pardas, el rendimiento fluctuó entre 6 a 14% (base seca), con un contenido de sulfatos de 6 a 28%. En todas las algas pardas, se detectó la presencia de fucosa; esta fue el azúcar predominante en especies intermareales como *S. compressa* y *H. californicus*, así como en la muestra comercial de *Ascophyllum*, mientras que en *E. arborea*, *M. pyrifera*, *E. menziesii*, *H. dioica* y *P. durvillaei*, la fucosa representó solo un porcentaje menor de los carbohidratos extraídos. En el mismo sentido, las algas verdes de este estudio, dieron positiva la prueba para ramnosa; donde, para las especies de *Ulva* fue el azúcar principal (ulván). Sin embargo, en *Codium*, la ramnosa, representó solo un bajo porcentaje del total de carbohidratos extraídos (< 10%), esto es una fuerte evidencia de que esta especie posee PS diferentes a los ulvanos. Se pudo observar entonces que la composición de los PSNG, en las diferentes especies de macroalgas, guardan ciertas similitudes taxonómicas; en este sentido dentro de las algas pardas de este estudio, aquellas especies que pertenecen a la familia Fucaceae como *S. compressa* y *H. californicus* tienen mayor semejanza con los polisacáridos sulfatados que se obtienen de *Fucus vesiculosus*, especie de la misma familia y de la cual se obtiene el fucoidán comercial.

Una vez definido el contenido de PS de las diferentes especies estudiadas, esta investigación se enfocó en caracterizar estos polisacáridos presentes en algas pardas y verdes de la región. En las algas pardas se seleccionó a la macroalga intermareal *S. compressa*, mientras que de las algas verdes se estudio a *U. clathrata*. En los polisacáridos sulfatados de *S. compressa*, se evaluó el efecto en la composición de factores ambientales, como, la localidad geográfica en que crece y la temperatura y factores biológicos como tipo de tejido del cual se obtienen; adicionalmente, se determinó la heterogeneidad en su composición química. Para evaluar diferencias en relación a la localidad geográfica, se colectaron muestras en tres puntos de Baja California (de norte a sur, Eréndira, San Quintín y El Rosario); aunque se observó que el rendimiento de PS y contenido de sulfatos, se incrementan de norte a sur, el rango de variación obtenido entre localidades, fue cercano al 1%; para Eréndira localidad más norteña, el contenido de PS fue de 15% con 11% de sulfatos, mientras que para El Rosario fue de un 16% de PS con 12.1% de sulfatos. Por otra parte, para evaluar el efecto de la temperatura, organismos de *S. compressa*, se sometieron durante 30 días a diferentes temperaturas de cultivo (10, 15 y 20°C); la variación observada en el rendimiento de polisacáridos sulfatados, entre las temperaturas probadas fue menor del 1%; el menor rendimiento de 9.59% ocurrió a la temperatura más baja; mientras que a

20°C se obtuvo un rendimiento de 10.25%. Sin embargo, el efecto de la temperatura de cultivo, fue más evidente en el contenido de sulfatos; estos, mostraron un patrón inverso respecto a la temperatura, donde un mayor contenido correspondió a la temperatura menor de 10°C con 18.83% de sulfatos, mientras que el contenido disminuyó hasta 13.65% a 20°C.

Para evaluar la composición de los polisacáridos en función del tejido, se separaron diferentes tejidos (basal, fruto y ápices) de *S. compressa* mantenida en cultivo a 10°C. Se encontraron diferencias en el contenido de sulfatos, donde el tejido nuevo (ápices), presentó el menor contenido, mientras que el fruto fue la parte más sulfatada.

La heterogeneidad de los polisacáridos solubles de *S. compressa*, se demostró, mediante una precipitación con etanol al 50% con y sin sales de magnesio ($MgCl_2$ 0.1M). Se obtuvieron una fracción soluble y una insoluble, ambas, de composición diferente. En ambas fracciones se detectó fucosa y grupos hemiéster sulfato; la fracción soluble, mostró un mayor contenido de sulfatos; sin embargo, los ácidos urónicos estuvieron ausentes en esta fracción y ocurrieron solo en la fracción insoluble. Por otra parte, con la presencia de magnesio en la precipitación, la fracción soluble, contiene mayor contenido de fucosa y grupos hemiéster sulfato que la fracción obtenida solo con etanol. Los espectros de infrarrojo mostraron diferencias entre las fracciones obtenidas.

Con el propósito de separar las moléculas en función de sus cargas, el polisacárido se sometió a cromatografía de intercambio aniónico. Se empleó la resina (DEAE-52) y el polisacárido, se eluyó, mediante un gradiente salino (NaCl de 0 a 2M). Se obtuvieron 4 fracciones, todas de composición diferente; la primera fue una fracción menor formada por azúcares neutros, la segunda fracción, también menor, formada exclusivamente de ácidos urónicos; mientras que la tercera fracción, la mayor en proporción, se compone principalmente de fucosa, con una pequeña cantidad de ácidos urónicos; la cuarta fracción obtenida, está compuesta exclusivamente de fucosa. Por lo tanto, los resultados obtenidos, confirman que los polisacáridos solubles de las algas pardas son entidades heterogéneas constituidas por grupos de polisacáridos de composición y densidad de cargas diferentes.

En la última parte de este estudio, con la finalidad de obtener información acerca del contenido y composición de los polisacáridos solubles (PSNG) presentes en las algas verdes (Ulvales), se estudiaron los polisacáridos presentes en el alga verde *Ulva clathrata*. Para este propósito, se realizó una extracción secuencial a 60°C empleando diferentes medios acuosos. Una primer fracción (F-I) se obtuvo en tres medios diferentes: Agua, EDTA y HCl; posteriormente en el material residual de cada extracción, se realizó una extracción secuencial ahora con NaOH 0.1M, fracción II (F-II). El extracto seco obtenido en cada fracción, se analizó para evaluar el contenido de carbohidratos totales, proteínas, ramnosa, ácidos urónicos y sulfatos. Para cada uno de los tratamientos probados, se obtuvieron diferencias en el rendimiento y composición

en ambas fracciones (F-I and F-II). En general para los tres medios empleados, se obtuvo un rendimiento mayor para la primera fracción (F-I), que el obtenido en la extracción secuencial (F-II). Los mejores rendimientos obtenidos para ambas fracciones, fueron los correspondientes al tratamiento con HCL (14.83 ± 1.5 y $5.96 \pm 1.1\%$, para F-I y F-II respectivamente). En relación a la composición, aunque ambas fracciones presentaron los mismos componentes (ramnosa, ácidos urónicos, proteínas y grupos sulfato), F-I en todos los casos fue la fracción más sulfatada (con 27 a 35.8%) y con mayor contenido de ramnosa (16.99 to 34.52%); por otra parte, en la fracción II se obtuvo un contenido mayor de proteínas y un contenido ligeramente mayor de ácidos urónicos. En congruencia con los resultados del análisis químico, el espectro de infrarrojo (FTIR), mostró que los polisacáridos solubles del alga verde *U. clathrata*, corresponden a PSNG, similares al ulván, obtenido de otras especies de *Ulva*; en este sentido el espectro de $^1\text{H-NMR}$, muestra en campo alto (1.2-1.3 ppm), la presencia de la señal característica del metilo de la ramnosa.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SULFATED POLYSACCHARIDES NON GALACTANS FROM MACROALGAE AND FACTORS THAT AFFECT THEIR COMPOSITION.

The marine algae are an important source of ionic polysaccharides. In contrast of that happen in terrestrial plants, in the seaweeds there is higher proportion of ionic polysaccharides respect to neutral ones. Particularly, the sulfated polysaccharides (PS), are widely distributed among the different macro algae divisions, but they are absent in terrestrial plants. According to the constituents sugars, the PS, are classified in two main groups; those formed by galactose or sulfated galactans (PGS), as in agar and carrageenan from red seaweeds and in some green seaweeds. In the second group, the PS is constituted by sugars different to the galactose (PSNG); the last one the constituents sugars are deoxy sulfated sugars as fucose in brown seaweeds and rhamnose in green seaweeds (Ulvales). In this study, were evaluated different brown and green seaweeds species, from the Mexican pacific template sea, that with the purpose to know and evaluate the PSNG content and their chemical characteristics.

In a first stage, the extraction methods were evaluated, that in function of yield and sulfate groups content. As raw material, the brown seaweed *Silvetia compressa*, was extracted in several aqueous media (agua, HCl, NaOH/CaCl₂ y CaCl₂) each one held at different temperatures (20, 60 y 80°C). The obtained result, shown that the yield and chemical characteristic of the products, were influenced by the extraction methods. In general, better yield (from 3.15 to 15.49% in seaweed dry weight) was obtained with the acid extraction; however this media didn't have the better sulfate content. The best sulfate content (18.9 a 28.3%), was achieved with the CaCl₂ extractions; in contrast, to this media, corresponded the worst yields. In all cases, a positive correlation between the yield and temperature was observed. However, the observed sulfate content increase, was not proportional to the yield increase; suggesting, that higher temperature, increase the solubility of materials others than sulfated sugars (neutral polysaccharides). In function of yield, sulfate content and solubility characteristic of the obtained products, the HCl extraction at 60°C, was the adopted conditions for the next study stage.

In a second stage, a survey of representative seaweeds from Baja California coast was carried. Were collected 12 seaweed species, eight phaeophytas: *Silvetia compressa*, *Hesperophycus californicus*, *Macrocystis pyrifera*, *Eisenia arborea*, *Halidrys dioica*, *Egrecia menziesii*, *Padina durvillaei* y *Sargassum johnstonii*, and four chlorophyta species: *Codium fragile*, *Ulva lactuca*, *Ulva nematoidea* and *Ulva clathrata*. The PS content and composition was evaluated. The results, shown variations of PS content between species and between algae divisions. Better PS yield (10 to 30% dry weight) with higher hemiester sulfate content (7 to 32%) was obtained for the green seaweeds; in the brown seaweeds the yield was between 6 to 14% dry weight basis and the sulfate

content between 6 to 28%. In all the brown seaweeds, the sugar fucose, was detected and this was the main sugar for the intertidal species, as *S. compressa* and *H. californicus*, and in the commercial sample of *Ascophyllum nodosum*; while in *E. arborea*, *M. pyrifera*, *E. menziesii*, *H. dioica* and *P. durvillaei*, fucose represented a low percentage of the total sugar extracted. In the same way in green seaweeds, the sugar rhamnose was detected; this was the main sugar in *Ulva* species (ulvan). But in *Codium*, rhamnose, only represented a low percentage of the total extracted carbohydrate (< 10%), then that was a strong evidence that the PS of this specie, are different to ulvans. With this was assessed that the PSNG composition between macroalgal species, keeps taxonomic similarities; then PS of the brown seaweeds belonging to Fucaceae family as *S. compressa* y *H. californicus*, are more related to PS of *Fucus vesiculosus*, specie belonging to the same family, and source of the commercial fucoidan.

Since the PS content of the different seaweeds species were defined, this research was focused in characterize the PS present in brown and green seaweeds from the region.

For the next stage, the intertidal brown seaweed *S. compressa* and the green seaweed *U. clathrata* were selected. In *S. compressa*, the effect of environmental factors in PS composition was evaluated; factors as geographical locality, the temperature and biological factors (tissue type); the chemical heterogeneity was determined. In order to evaluate differences related to geographical locality, were collected samples in three different points of the Baja California coast (Eréndira in the north, San Quintín in the middle and El Rosario in the south); although the yield of PS and sulfate content, increase southward, the variation range, between localities was only ca. 1%; in Eréndira the northern locality, the PS yield of 15% with 11% sulfate content; while an 16% yield with 12.1% sulfate content, correspond to the southern locality, El Rosario. In the other hand, the temperature effect was evaluated in *S. compressa*, held for 30 days at three different temperatures (10, 15 and 20°C); as in the locality the differences between temperatures was less than 1%; lower yield (9.59%) was for the lower temperature (10°C); while a yield of 10.25% corresponded to 20°C. Nevertheless, the temperature effect was more evident in the sulfate content; a inverse relationship with the temperature was observed; higher sulfate content (18.83%) correspond to the lower temperature (10°C), while the content decrease to 13.65% at 20°C.

In order to evaluate the PS composition as function of tissue type; *S. compressa* growing in culture at 10°C, was divided in different parts (basal, fruit and apical). Differences, in sulfate content were observed, the new tissue (apical) shown lower sulfate content, while the fruit corps were more sulfated.

The chemical heterogeneity of the soluble polysaccharides of *S. compressa*, was demonstrated by ethanol at 50% precipitation, with and without magnesium salts (MgCl₂ 0.1M). The obtained, soluble and insoluble fractions, were different in composition. Both fractions, contained fucose and hemiester sulfate groups. The soluble fraction had

higher sulfate content; but in contrast, the uronic acids were absent. In other side, the presence of magnesium salts in the precipitation led to a higher fucose and sulfate content than those obtained just with ethanol precipitation. In agreement with the chemical results, the infrared (IR) spectra, shown differences between the fractions.

With the purpose

To separate molecules in function of their charge, the PS was subjected to an anionic exchange chromatography. The anionic exchange resin DEAE-52, was used and the polysaccharide was eluted in a salt gradient (NaCl from 0 to 2M). Four fractions of different composition were obtained. The first, was a minor fraction, composed mainly by neutral sugars; the second one, also a minor fraction, composed exclusively by uronic acids; while the third, the main fraction, was mainly composed by fucose and lower amount of uronic acids. The last, a minor fraction too, was exclusively composed by fucose. Then based in the obtained results in function of sugar composition and charge density, the PS heterogeneity was confirmed.

In the last part of this research, with the objective to get knowledge, on content and composition of the soluble polysaccharides (PSNG) in green seaweeds (Ulvales), the polysaccharides from *U. clathrata*, were analysed. In order to meet this purpose, a sequential extraction at 60°C employing different aqueous media. A first fraction (F-I) was obtained for the three different media: Water, EDTA and HCl; afterwards, in the residual material from each extraction, a sequential extraction was performed, now with NaOH 0.1M solution; the fraction II (F-II) was obtained. The dry extract obtained in each fraction, was analysed to evaluate, total carbohydrate, proteins, rhamnose, uronic acids and sulfate content. For each of the tested treatments, differences in yield and composition were obtained for both fractions (F-I and F-II). In general, for the three employed media, higher yield corresponded to F-I, respect to the sequential F-II. For both fractions the best yield (14.83 ± 1.5 and $5.96 \pm 1.1\%$, for F-I and F-II respectively) corresponded to HCl treatment. In relation to composition, even though the same components (rhamnose, uronic acids, proteins and sulfate groups) were present in both fractions; in all cases F-I was more sulfated (27 to 35.8%) and with higher rhamnose content (16.99 to 34.52%); in contrast F-II had higher protein content and slightly uronic acid percentage. In agreement with the chemical analysis results, the FTIR spectra, demonstrated that the soluble polysaccharides, of the green seaweed *U. clathrata*, are PSNG similar to ulvan rendered by others *Ulva* species. In the same way the $^1\text{H-NMR}$ spectrum, showed a distinctive signal at high field correspondent to methyl group from rhamnose.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

CARACTERIZACIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS
NO GALACTANOS DE ALGAS MARINAS Y FACTORES QUE INFLUENCIAN
SU COMPOSICIÓN.

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

QUE PRESENTA EL ALUMNO

ENRIQUE HERNÁNDEZ GARIBAY

Aprobada por:



DR. JOSÉ ANTONIO ZERTUCHE GONZÁLEZ
Presidente del jurado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
MARINAS



DR. ISAI PACHECO RUÍZ
Sinodal



DR. JAIME LIZARDI MENDOZA
Sinodal



DR. JESÚS IVÁN MURILLO ÁLVAREZ
Sinodal



DR. ROBERTO MILLÁN NÚÑEZ
Sinodal

DEDICATORIA

A mi esposa Martha

Quién ha sido mi sostén incondicional en este reto de mi vida. Sin su apoyo, alcanzar esta meta no hubiera sido posible.

Martha, este logro es nuestro!

A mis hijos

Karina, Enrique y Tania

Ustedes han sido motivo de inspiración para no flaquear en este arduo camino.

A mis padres

José María y Hermelinda

A ustedes que siempre nos inculcaron una forma honesta de ser.

Fuimos hechos a semejanza de ustedes que nos formaron!

A mis hermanos

Ramón, José Luis, Nena, Manuel, Tere, Lupita, Toti, Chema, Paco y Rosy

Ya que todos nosotros somos parte de los sueños y logros de nuestros padres.

Una dedicatoria muy especial, a mis maestros:

Dr. Hector David Rivera Carro (Qepd)

Prof. Bjorn Larsen (Qepd)

Dr. Olav Smidsrod y Dr. Sverre Myklestad

Quienes fomentaron en mí el gusto por ésta línea del conocimiento.

Al Dr. Jorge de la Rosa Vélez, quién fue miembro de mi primer comité de tesis (Qepd).

A los colegas del proyecto “Recursos Algales” que también se nos adelantaron (Qepd).

QFB Gerardo Blanco Sánchez y “El Chocha”

Al colega Ocean. Raúl Aguilar Rosas (Qepd).

A mis colegas del proyecto Algas Marinas y Planta Piloto de carragenanos del CRIP-Ensenada: MC Julián Guardado, Ing José Bautista y Ocean Carlos Caloca.

A todos mis colegas oceanólogos, biólogos y ahora también biotecnólogos, que durante muchas generaciones, me han permitido estar al frente, en el aula de clases, compartiendo conocimientos y experiencias.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité de tesis, por su tiempo, orientación, revisiones y apoyo en la realización de este trabajo.

Un agradecimiento muy especial a mi director de tesis Dr. José Zertuche; en primera instancia, por su amistad y por sus atinados consejos, comentarios e ideas; por su orientación en el desarrollo de esta tesis y por el apoyo moral que me ha brindado en todo momento.

Al Dr. Isaí Pacheco Ruíz, además de sus valiosas revisiones, por su apoyo y toda la confianza que me ha brindado durante mi estancia en el IIO, misma que ha repercutido en 2 tesis de licenciatura y 2 publicaciones.

Dr. Roberto Millán Núñez, por su apoyo honesto y permanente desde Ciencias Marinas.

Al Dr. Jesús Iván Murillo Álvarez y Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por sus valiosas revisiones y comentarios, que sin duda han contribuido a mejorar notablemente este trabajo, agradezco su amistad y su gran disposición a colaborar.

A la Dra. Irma Soria Mercado, por su buena disposición en compartir su laboratorio, el uso del espectro de infrarrojo FCM y por los espectros de RMN en SCRIPPS.

Al Dr. Luis A. Cupul Magaña, coordinador del posgrado FCM, por su gran apoyo en ésta última etapa de mi tesis.

Al Dr. Miguel Ángel Hurtado Oliva, por su valiosa ayuda en el procesamiento estadístico.

A los colegas del laboratorio de macroalgas:

M.C. Victor A. Macías Carranza, por compartir conmigo el cubículo, materiales, equipo y experiencias, que facilitaron mi trabajo.

Al Biol. Alberto Gálvez Télles y al Ocean. José M. Guzmán Calderón, por estar siempre con muy buena disposición para ayudar y estar al pendiente de lo que se ocupara en el laboratorio.

Al Dr. Alejandro Cabello Pasini, por su apoyo y comentarios, siempre certeros y alentadores.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas (IIO) y la Facultad de Ciencias Marinas, por facilitarme las instalaciones y el apoyo logístico.

Al Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura, por la beca de tiempo otorgada. A la dirección en jefe del INP, Dr. Guillermo Campeán Jiménez, que me otorgó la beca, posteriormente el Dr. Miguel Ángel Cisneros Mata, por el apoyo durante su administración y al actual director en jefe Maestro Raúl Adán Romo Trujillo, por continuar apoyándome para cumplir con este cometido.

A la Dirección General del Pacífico Norte, primero el Biólogo Luis Francisco Beléndez Moreno y posteriormente el Dr. Abraham Navarrete del Proó.

De la misma manera no puedo dejar de agradecer a los directores del CRIP-Ensenada que me han apoyado durante sus respectivas administraciones: MC Julián Guardado Puentes, quién me ayudó a tramitar la beca de tiempo, Dra. Silvia M. Ortiz Galarza, MC Marisol Aguilar Torres y durante este último año, una gran paciencia de la Dra. Alma Rosa García Juárez.

Un agradecimiento especial para la Lic. Gabriela Vázquez Rodríguez administradora del CRIP, por las facilidades otorgadas siempre.

Y no puedo olvidar de agradecer a mis colegas del CRIP, que de una u otra forma, me han estado apoyando y dándome ánimos para llegar a la meta: Fidelia Caballero, José Bautista, Julián Guardado, Horacio Haro, José Ramón Corrales, Julio Palleiro y Julián J. Castro. gracias!

A mis amigos en el retiro, que han estado al pendiente de este proceso: Ignacio Contreras, Carlos Caloca, María Martha, Trinidad Silva, Alfredo Cota, José Ramón González y Manuel de la Rosa.

A los compañeros del CRIP, por su apoyo; sin la intención de omitir a nadie, menciono los siguientes: Miguel Ángel Espinosa, Enrique Sánchez, Hector Valles, Humberto Robles, Rafael Sánchez, Michel Dreyfus, Eva Coteró, José Luis Rivera, Guillermo Ortuño, Leonardo Castillo, Lourdes Salgado, David Aguilar, Sandra Vázquez, Francisco Martínez, Manuel Romero, Eduardo Vázquez, Francisco Uribe, Ricardo Troncoso y Ricardo Soto.

A los colegas Raúl Yépiz y Rafael Blanco, por sus consejos y apoyo en momentos críticos.

GRACIAS!

Índice general

	PÁGINA
RESUMEN	II
ABSTRACT	VI
VOTOS PROBATORIOS	IX
DEDICATORIA	X
AGRADECIMIENTOS	XI
ÍNDICE	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
LISTA DE TABLAS	XVII
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	12
CAPÍTULO I: Extracción de polisacáridos sulfatados de algas pardas...	13
CAPÍTULO II: Evaluación del contenido y composición de polisacáridos sulfatados de especies de macroalgas abundantes en Baja California.	32
CAPÍTULO III: Caracterización química de los polisacáridos sulfatados (fucoidán) del alga parda <i>Silvetia compressa</i> y sus variaciones.....	58
CAPÍTULO IV: Aislamiento y caracterización química de los polisacáridos solubles del alga verde <i>Ulva clathrata</i> (Roth) C. Agardh...	86
CONCLUSIONES GENERALES	104
RECOMENDACIONES	105
BIBLIOGRAFÍA GENERAL	106
ANEXOS: Artículo publicado Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed <i>Ulva clathrata</i> (Roth) C. Agardh.	118

Lista de Figuras:	Página
Figura 1 Tendencia temporal en el desarrollo de productos a partir de organismos marinos (Gu-Ping <i>et al.</i> , 2011).	4
Figura 2 Tendencia temporal en el número de nuevos compuestos, aislados de diferentes organismos marinos (1985-2008). Invertebrados marinos, algas marinas y microorganismos marinos (incluido fitoplancton) (Gu-Ping <i>et al.</i> , 2011).	5
Figura 3 Tendencia en el número de nuevos compuestos, aislados de las diferentes divisiones de algas marinas, algas pardas Algas rojas y algas verdes (Gu-Ping <i>et al.</i> , 2011).	5
Figura 4 Árbol filogenético esquemático de la distribución de los polisacáridos sulfatados en macroalgas, angiospermas e invertebrados marinos (Modificado de Pomin y Mourao, 2010).	6
Figura 5 Fórmula estructural de Haworth y conformación 1C4 de los azúcares a) α -L-fucosa y b) α -L-ramnosa.	8
Figura 1.1 Aspecto general de un talo de <i>Silvetia compressa</i> (escala 2 cm) y de sus receptáculos (escala 1 cm), (tomado de Aguilar-Rosas <i>et al.</i> , 2002).	18
Figura 1.2 Distribución de las especies de algas pardas de la familia Fucaceae en la costa del Pacífico de México. <i>Hesperophycus californicus</i> , <i>Silvetia compressa</i> subsp. <i>compressa</i> y <i>S. compressa</i> subsp. <i>deliquescens</i> . El Rosario B.C. es la localidad de colecta de los ejemplares de este estudio. El alga parda: <i>Silvetia compressa</i> subsp. <i>compressa</i> . (Modificado de Aguilar-Rosas <i>et al.</i> , 2002).	19
Figura 1.3 Pradera intermareal de macroalgas en Punta Baja (El Rosario B.C.); se muestra la distribución en bandas paralelas a la costa característica de las especies intermareales en el Pacífico templado mexicano.	20
Figura 1.4 Modelo de la estructura original propuesta para el fucoidán (A) estructura conformacional (Percival y Ross, 1950).	27-28
Figura 2.1 Localidades donde se colectaron los ejemplares de este estudio. Las algas pardas: <i>Silvetia compressa</i> , <i>Hesperophycus californicus</i> , <i>Halidrys dioica</i> , <i>Egregia menziesii</i> , <i>Eisenia arborea</i> , <i>Macrocystis pyrifera</i> , en el Pacífico, mientras que <i>Padina durvillaei</i> y <i>Sargassum johnstonii</i> en el Golfo de California. Las algas verdes <i>Ulva lactuca</i> , <i>U. nematoidea</i> y <i>Codium fragile</i> se colectaron en las localidades	

de San Quintín y El Rosario B.C., mientras que <i>U. clathrata</i> de tanque de cultivo en el IIO-UABC.	37
Figura 2.2 Algas del pacífico templado mexicano empleadas en este estudio. <i>Silvetia compressa</i> (1), <i>Hesperophycus californicus</i> (2), <i>Halidry dioica</i> (3), <i>Egrecia menziesii</i> (4), <i>Eisenia arbórea</i> (5), <i>Macrocystis pyrifera</i> (6), en el Pacífico, mientras que <i>Padina durvillaei</i> (7) y <i>Sargassum johnstonii</i> (8) en el Golfo de California. Las algas verdes <i>Ulva lactuca</i> (9), <i>U. nematoidea</i> (10). <i>Ulva clathrata</i> (11) y <i>Codium fragile</i> (12), así como una muestra comercial de <i>Ascophyllum nodosum</i> (13).	38
Figura. 2.3 Rendimiento de carbohidratos solubles en especies de macroalgas de la región. Método gravimétrico. Se muestra su contenido de grupos hemiéster sulfato (OSO ³⁻), barras verticales representan el error estándar n=3).	47
Figura 2.4 Espectros de infrarrojo de polisacáridos solubles obtenidos en medio ácido de algas pardas.	53
Figura 2.5 Espectros de infrarrojo de polisacáridos solubles en medio ácido obtenido de especies de algas verdes.	54
Figura 3.1 Estructura repetitiva encontrada en el Fucoídán de <i>Fucus vesiculosus</i> y <i>Ascophyllum nodosum</i> (Berteau y Mulloy, 2003).	61
Figura 3.2 Localidades de cosecha de <i>S. compressa</i> , en la costa del pacífico de Baja California.	64
Figura 3.3 Talo del alga parda <i>S. compressa</i> , donde se muestra los diferentes tejidos.	66
Figura 3.4 Esquema que muestra los tratamientos a que se sometió <i>S. compressa</i> . Las temperaturas a las que se sometieron las plantas, se eligieron en función de las fluctuaciones de temperatura que ocurren naturalmente en el medio ambiente en que se desarrollan.	67
Figura 3.5 Esquema que muestra la fraccionación del fucoídán de <i>S. compressa</i> en una columna de resina de intercambio aniónico (DEAE-52) de 1.5 x 12cm.	72
Figura 3.6 Contenido fucoídán de <i>S. compressa</i> de tres localidades de Baja California y su contenido de grupos sulfato (1.- Eréndira 2.- San Quintín 3.- El Rosario). Donde las barras verticales muestran el error estándar, (n=3).	74
Figura 3.7 Espectros de infrarrojo del fucoídán obtenido mediante	

fraccionación con etanol con y sin MgCL ₂ ; donde a) es la fracción insoluble y b) fracción soluble.	78-79
Figura 3.8 Fraccionación de fucoídán por cromatografía de intercambio aniónico: Separación de un extracto ácido (Fucoídán) de <i>S. compressa</i> en columna de intercambio aniónico (DE-52) mediante un gradiente de concentración de NaCl (0-2M). Donde a) Azúcares totales b) Fucosa y c) Acidos urónicos.	81
Figura 4.1 Estructura de las principales estructuras disacáridas repetitivas encontrados en el ulvano; los ácidos ulvanobiurónicos A3s y B3s y las ulvanobiosas U3s y U's,3s (Lahaye, 2001).	88
Figura 4.2 Localidad de colecta de <i>Ulva clathrata</i> . Proviene de granja comercial productora de camaron en Mochis Sin.	90
Figura 4.3 Diagrama de flujo que muestra la extracción secuencial de polisacáridos solubles del alga verde <i>U. clathrata</i> .	92
Figura 4.4 Espectro de infrarrojo (IR) obtenido de extractos aislados de <i>U. clathrata</i> , donde a y b corresponden a los espectros de las fracciones F-I y F-II respectivamente. En cada fracción, los números de los espectros 1,2 y3, corresponden al medio de extracción, agua, Na ₂ EDTA y HCL respectivamente.	98
Figura 4.5 Espectro de resonancia magnetica nuclear de protón (RMN-H ¹) de los polisacáridos soluble en HCl, aislados de <i>U. clathrata</i> .	99

Lista de Tablas.

Tabla I.1 Rendimiento de fucoidán (% en base seca) obtenido del alga parda <i>Silvetia compressa</i> en diferentes medios (Agua, HCl, NaOH/CaCl ₂ , CaCl ₂) y variando la temperatura (20, 60 y 80°C).	23
Tabla I.2 Contenido de sulfatos en el fucoidán extraído bajo diferentes medios y temperaturas del alga parda <i>S. compressa</i> .	23
Tabla I.3.1 Comparación múltiple a posteriori en el rendimiento de fucoidán en función del medio (A) y temperatura (B) de extracción y (C) ambos factores (Tukey para diferente n), donde las medias que no comparten las mismas letras, son significativamente diferentes (P< 0.05).	24
Tabla I.3.2 Comparación múltiple a posteriori en el contenido de sulfatos en función del medio (A) y temperatura (B) de extracción y ambos factores (C) (Tukey para diferente n), donde las medias que no comparten las mismas letras, son significativamente diferentes (P< 0.05).	25
Tabla II.1 Listado de especies del Pacífico templado mexicano, empleadas en este estudio; se incluye, división localidad y fecha de colecta.	39
Tabla II.2 Autoridad de las especies empleadas.	40
Tabla II.3 Rendimiento de carbohidratos solubles y contenido de grupos hemiéster sulfato (OSO ₃ ⁻) en especies de macroalgas de la región. Método gravimétrico. En % del peso seco del alga n=3	44
Tabla II.4 Composición de los polisacáridos solubles de algas pardas de las costas de Baja California. Evaluadas por el método indirecto (Larsen, 1978). Se realizaron 4 réplicas.	48
Tabla II.5 Composición de los polisacáridos solubles de algas verdes de las costas de Baja California. Evaluadas por el método indirecto (Larsen, 1978). Se realizaron 4 réplicas.	48
Tabla II.6 Contenido de polisacáridos solubles en algas de la región. Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha= 0.05$, Error entre el cuadrado de las medias= 4.04, gl = 18.	49
Tabla II.7 Contenido de sulfatos en los polisacáridos solubles de macroalgas de la región. Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Donde letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha= 0.05$, Error entre el cuadrado de las medias= 0.55, gl = 44.	50
Tabla II.8 Contenido de polisacáridos solubles en algas de la región	

(Método indirecto Larsen, 1978). Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha = 0.05$, Error entre el cuadrado de las medias = 1.14, gl = 37.	51
Tabla II.9 Contenido de Ramnosa en algas verdes. Prueba a posteriori de Tukey para grupos homogéneos $\alpha = 0.05$; Error: Entre el cuadrado del promedio = 0.58, gl = 12. Letras iguales no hay diferencias significativas.	52
Tabla II.10 Razón molar de componentes Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos, calculada para los extractos ácidos obtenidos de las diferentes especies de algas pardas.	52
Tabla II.11 Razón molar de componentes Ramnosa: Sulfatos: Ac. Urónicos , calculada para los extractos ácidos obtenidos de las diferentes especies de algas verdes.	53
<hr/>	
Tabla III.1 Rendimiento de polisacáridos sulfatados y su contenido de grupos hemiester sulfato, obtenido de muestras de <i>S. compressa</i> sometida a diferentes temperaturas (t= 30 días y n=3).	75
Tabla III.2 Relación de componentes evaluado en los polisacáridos sulfatados de componentes del fucoidán de <i>Silvetia compressa</i> en función del tejido.	75
Tabla III.3 Razón molar de componentes del fucoidán de <i>Silvetia compressa</i> en función del tejido.	76
Tabla III.4 Composición química de las fracciones del fucoidán de <i>Silvetia compressa</i> , obtenidas mediante fraccionación con 50% de etanol con y sin sales de magnesio ($MgCl_2$ 0.1M) (% \pm D. Estándar n=3).	80
Tabla III.5 Razón molar de componentes (Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos) de las fracciones obtenidas del fucoidán de <i>S. compressa</i> .	81
Tabla IV.1 Composición química de los polisacáridos soluble de <i>U. clathrata</i> , extraídos en medios diferentes (agua, Na_2 EDTA y HCl) Fracción I y Fracción II obtenida por extracción secuencial con NaOH 0.1 M (n=3).	95
Tabla IV.2 Razón molar de componentes (Ramnosa: Sulfatos: Acidos Uronicos) calculada para las fracciones F-I y F-II obtenidas por extracción secuencial de <i>U. clathrata</i> .	96
Tabla IV.3 Razón molar teórica (Ramnosa: Sulfatos: Acidos Urónicos: Xilosa) y su porcentaje (%) calculado para las estructuras idealizadas del ulvano, propuestas por Lahaye (2001).	96

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las algas marinas, son un grupo de plantas muy heterogéneo; éstas, en función de sus características, se agrupan en varias divisiones (clorofitas, rodofitas y faeofitas); entre las diferentes divisiones algales, solo existen relaciones remotas. Sin embargo, cuando entre ellas, ocurren similitudes bioquímicas significativas, estas, deben ser de mucho interés (Haug y Larsen, 1974).

Las macroalgas, son productores primarios; por lo que, emplean la energía solar y mecanismos de la fotosíntesis, para producir compuestos de carbono orgánico; quizás sea por ello, que las plantas se componen predominantemente de carbohidratos (Kloareg y Quatrano, 1988). Los carbohidratos en las algas marinas ocurren formando una amplia variedad de polisacáridos, en donde cumplen diferentes funciones; principalmente como reserva energética y estructurales (McCandless, 1981; Lobban y Harrison, 1994).

Los polisacáridos de reserva energética, son principalmente, polímeros de la glucosa (glucanos). Sin embargo, dependiendo de la división algal a la que pertenecen, presentan diferentes características estructurales. En las algas verdes, el polisacárido presente, es el almidón, éste polisacárido, tiene una gran similitud con el almidón terrestre, está formado, por una fracción lineal de α -D-glucosa enlazada en (1-4) llamada amilosa y una fracción ramificada o amilopectina, esta última incluye puntos de ramificación en α (1-6) glucosa; se diferencia del almidón terrestre, por ser de menor peso molecular. En las algas rojas, el polisacárido presente, es el almidón florideano, éste, es similar a la fracción ramificada del almidón (amilopectina). Por otra parte, el polisacárido de reserva en las algas pardas, es el laminarán; aunque el laminarán, en similitud con el almidón, tiene una fracción lineal y una fracción ramificada, difiere de este, en que los enlaces entre las glucosas tienen la configuración β (β 1-3 D-glucosa y β 1-6 D-glucosa) (McCandless, 1981; Painter, 1983).

En relación a los carbohidratos estructurales, la situación es más compleja; este grupo comprende el material esquelético insoluble de la pared celular y los polisacáridos solubles de la matriz inter y extracelular. A diferencia de lo que ocurre en plantas terrestres en los carbohidratos estructurales de las algas marinas, los componentes de la matriz se encuentran en una proporción mayor que los componentes esqueléticos, además se caracterizan en que en ellos prevalecen los polisacáridos aniónicos sobre los neutros (Kloareg y Quatrano, 1988; Lobban y Harrison, 1994).

Los polisacáridos esqueléticos son de carácter neutro e insolubles, formados por celulosa y hemicelulosa. Donde la celulosa, es un glucano de cadena lineal formado por la β (1-4) D-glucosa; mientras que la hemicelulosa se compone en la mayoría de las algas, principalmente por xilanos (Mackie y Percival, 1959) y en algunas algas por mananos (Iriki y Miwa, 1960; Kloareg y Quatrano, 1988; Popper y Tuohy, 2010).

Los polisacáridos de la matriz inter y extracelular, están formados por polisacáridos iónicos solubles. Estos polisacáridos, se caracterizan por contener grupos carboxilo (COO^-) en alginatos de algas pardas (Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988), grupos hemiester sulfato (OSO_3^-) en agar y carragenanos de algas rojas (Painter, 1983; Craigie, 1990) o ambos grupos (COO^- y OSO_3^-), como en fucanos de algas pardas (Percival, 1979; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988) y en galactanos y ramnanos de algas verdes (Percival, 1979; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988; Pomin y Mourao, 2010).

Entonces, en las algas marinas, Los polisacáridos sulfatados son los más ampliamente distribuidos; esto contrasta con la ausencia de ellos en plantas de agua dulce y plantas terrestres, (Lobban y Harrison, 1994). Además de las algas marinas, los polisacáridos sulfatados, también se presentan en invertebrados marinos (Pomin y Mourao, 2008), en una amplia variedad de tejidos de virtualmente todos los animales (Yang, 2000; Toida *et al.*, 2003) y recientemente se identificó la presencia de ellos en el pasto marino *Rupia marítima* (Aquino *et al.*, 2005).

A pesar de su amplia distribución, la estructura y composición de los polisacáridos sulfatados, varía entre los diferentes organismos marinos; aquellos que ocurren en las algas marinas, su estructura y composición es muy compleja y heterogénea (Pereira *et al.*, 1999; Berteau y Mulloy, 2003). En contraste, los polisacáridos presentes en las angiospermas marinas e invertebrados, son de estructuras más simples y homogéneas; (Mourao, 2004, 2007; Aquino *et al.*, 2005; Pomin, 2010).

La distribución y características de los polisacáridos sulfatados, en los diferentes organismos marinos, parece tener implicaciones evolutivas (Pomin y Mourao, 2010).

En particular, los polisacáridos sulfatados, de más amplia distribución entre diferentes grupos de organismos, son aquellos, que poseen a la galactosa (PGS) como unidad estructural; se presentan en algas rojas y verdes, así como en algunos erizos de mar, en angiospermas marinas y en tunicados. Estos, son polisacáridos altamente conservativos, formados por la β -(1-3) D-galactosa. Sin embargo, en algunos grupos taxonómicos de organismos marinos, difieren en su patrón de sulfatación, por ej. en macroalgas y angiospermas marinas, muestran una fuerte tendencia hacia la presencia de galactosa 4-sulfato, mientras que en invertebrados marinos ocurren como galactosa 2-sulfato (Figura 4) (Pomin, 2010; Pomin y Mourao, 2010).

Otro grupo importante de polisacáridos sulfatados, aunque de menor distribución entre organismos marinos, son aquellos en los que su unidad estructural es diferente a la galactosa (PSNG); estos se encuentran en algas pardas, en algunos grupos de algas verdes y en equinodermos (Kloareg y Quatrano, 1988; Lobban y Harrison, 1994; Pomin, 2010; Pomin y Mourao, 2010). En algas pardas y equinodermos, la unidad estructural de sus polisacáridos sulfatados, está formada por la fucosa y en algas verdes (Ulvales, Acrosiphonales y Urosporales), la ramnosa es el azúcar principal (Percival, 1979; Painter, 1983) (Figura 5).

En años recientes algunas firmas farmacéuticas, en la búsqueda de nuevas sustancias a partir de productos naturales, han puesto su atención en organismos marinos incluyendo las macroalgas (Figura 1, 2 y 3) (Smit, 2004; Gu-ping *et al.*, 2011). A pesar

de que las algas producen una amplia diversidad de metabolitos secundarios (Lobban y Harrison, 1994); en Baja California su aprovechamiento comercial, se ha restringido a su empleo como materias primas para la obtención de ficocoloides (Zertuche-González, 1993; Hernández-Garibay *et al.*, 2006). Fuera de esta línea de aprovechamiento, la obtención de productos extraídos de las algas marinas en nuestro país es muy limitada.

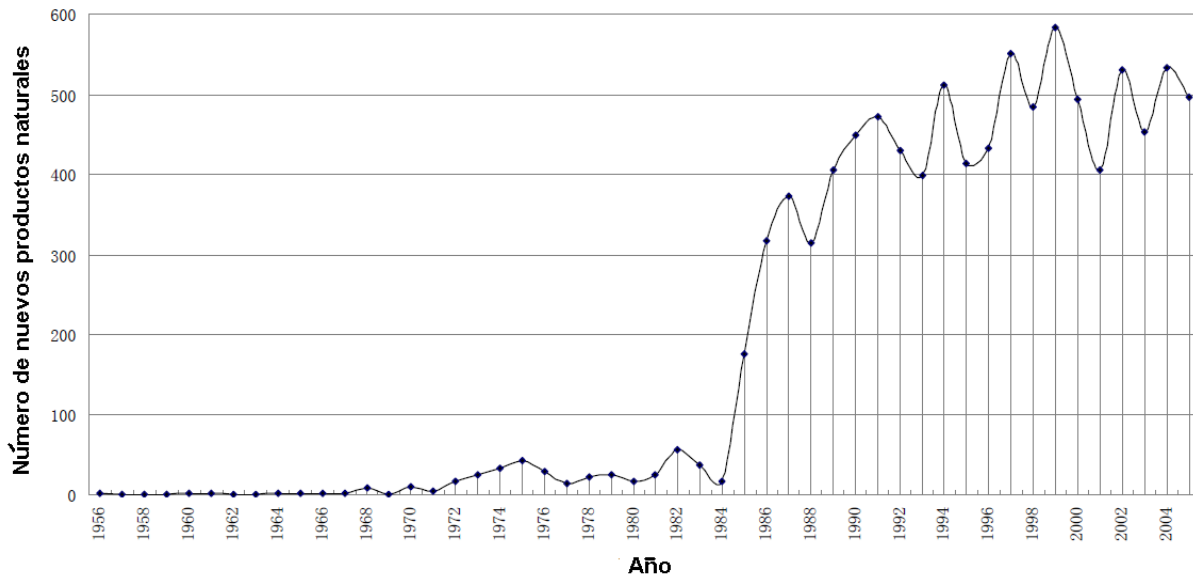


Figura 1. Tendencia temporal en el desarrollo de productos a partir de organismos marinos (Gu-Ping *et al.*, 2011).

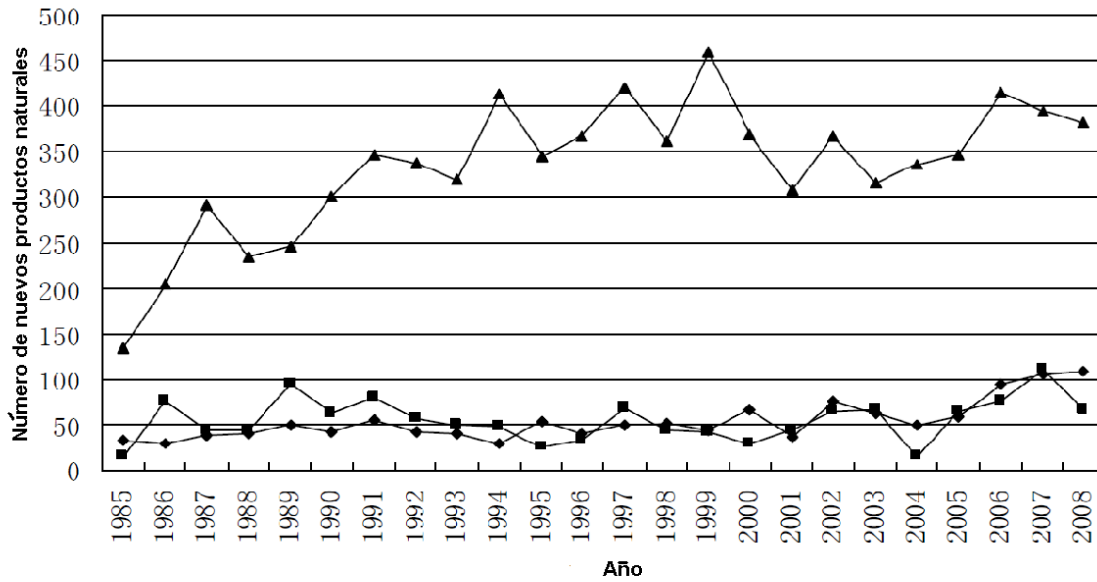


Figura 2. Tendencia temporal en el número de nuevos compuestos, aislados de diferentes organismos marinos (1985-2008). Invertebrados marinos ▲, algas marinas ■ y microorganismos marinos (incluido fitoplancton) ◆ (Gu-Ping *et al.*, 2011).

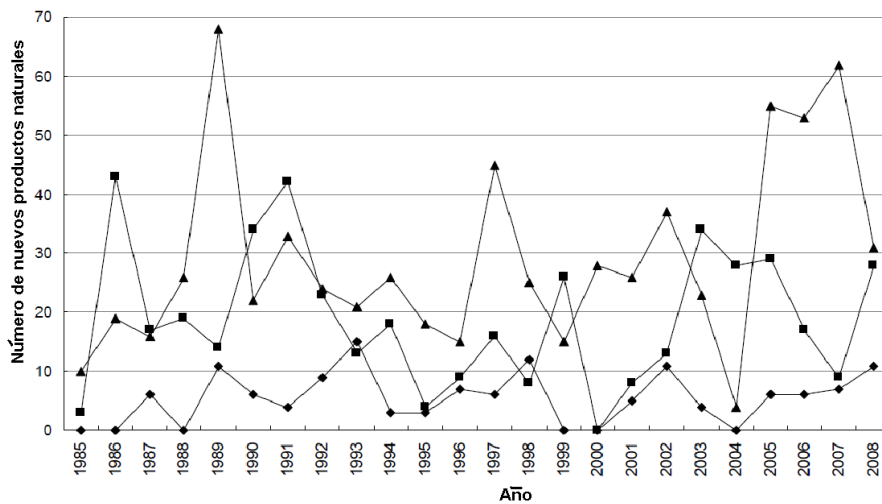


Figura 3. Tendencia en el número de nuevos compuestos, aislados de las diferentes divisiones de algas marinas, algas pardas ■, Algas rojas ▲ y algas verdes. ◆ (Gu-Ping *et al.*, 2011).

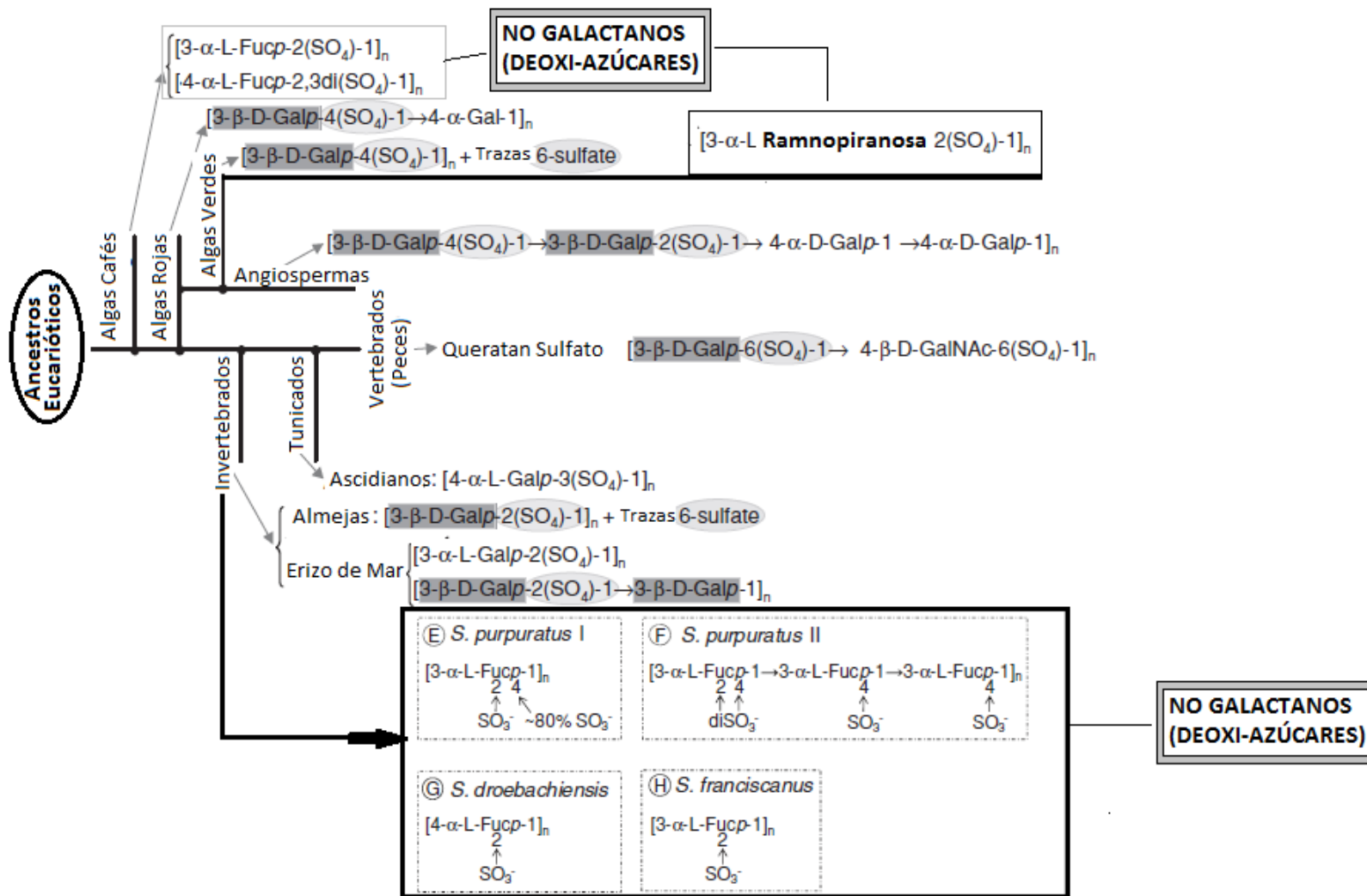


Figura 4. Árbol filogenético esquemático de la distribución de los polisacáridos sulfatados en macroalgas, angiospermas e invertebrados marinos (Modificado de Pomin y Mourao, 2010).

En las costas de México, se desarrolla una gran variedad de macroalgas; sin embargo, muy poco se conoce sobre su contenido y composición de los metabolitos presentes, los cuales, pudieran tener propiedades importantes en aplicaciones farmacéuticas, tales como compuestos antivirales, anticancerígenos, anticoagulantes, antitumorales, etc. En particular, para macroalgas del Pacífico templado mexicano, no existen estudios sistemáticos sobre los polisacáridos sulfatados no galactanos presentes; tal es el caso de los fucanos sulfatados de algas pardas y los ramnanos sulfatados de las algas verdes, los cuales en épocas recientes, han cobrado importancia por sus diversas aplicaciones, como anticoagulantes, agentes antitrombóticos, antitumorales y antivirales, entre otros (Maeda *et al.*, 1991; McLellan y Jurd, 1992; Chevolut, 1999; Chizov, 1999; Shanmugam y Mody, 2000; Mao, *et al.*, 2006; Murillo-Álvarez *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008).

En relación a los fucanos sulfatados, el término fucano, se aplica en general para aquellos polisacáridos cuya unidad monomérica principal es la fucosa (6-deoxi-L-galactopiranososa) (Fig. 5a); sin embargo, dado que éstos polisacáridos, se encuentran tanto en algas marinas, así como en invertebrados marinos, entonces, para diferenciarlos respecto a los de macroalgas, se les ha denominado fucanos sulfatados, mientras que el término fucoidán, se aplica para los polisacáridos sulfatados de las algas pardas (Pomin y Mourao, 2006).

En el caso de los ramnanos presentes en las algas verdes, contienen en su estructura el azúcar ramnosa (6-deoxi-L-manopiranososa) (Fig. 5b), a estos, se les aplica el término de ulván (Lahaye, 1991).

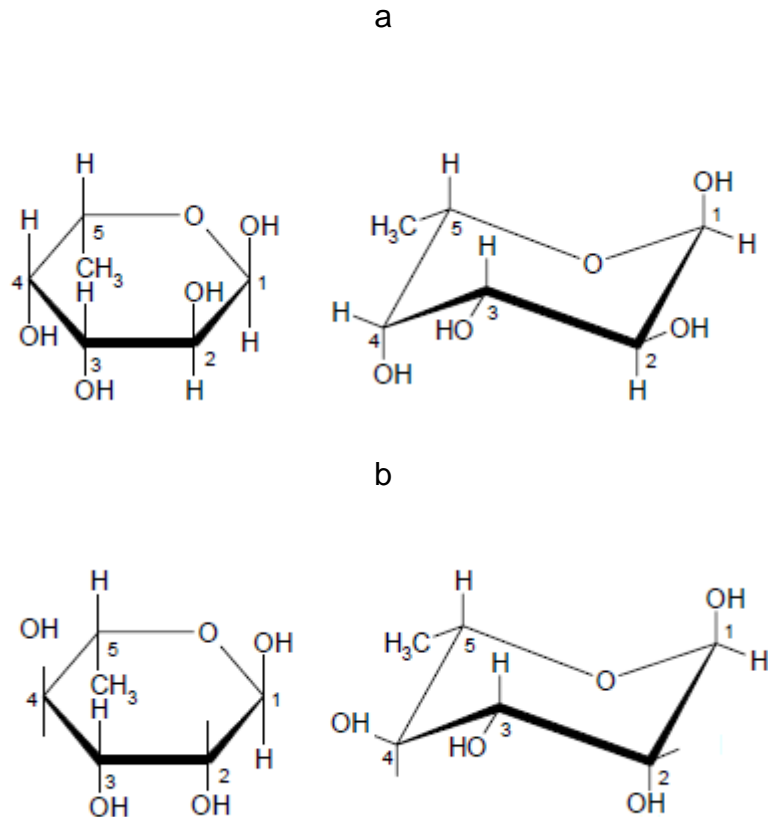


Figura 5. Fórmula estructural de Haworth y conformación 1C4 de las unidades monoméricas de fucanos y ramnanos, a) α -L- fucopiranososa y b) α -L- ramnopiranososa.

El fucoidán, es el componente de un complejo proteoglicano de las algas pardas, que exhibe una amplia diversidad estructural. Dentro de las algas, el fucoidán se entrelaza con proteínas y otros polisacáridos (eg. alginatos y celulosa); posee contenidos variables de fucosa, xilosa, galactosa, ácidos urónicos y grupos sulfato (McCandless y Craigie, 1979; Painter, 1983). Este complejo proteoglicano, puede fraccionarse en polisacáridos de composición diferente por métodos químicos; por ello, debe ser considerado como una familia de polisacáridos dispersos (Schweiger, 1962; Larsen *et al.*, 1970).

En este sentido, debe entenderse a los polisacáridos que contienen fucosa de las algas pardas, como sistemas formados por un espectro de moléculas de polisacáridos de composición diferente; desde aquellas que son ricas en ácidos urónicos y bajas en

fucosa sulfatada (Larsen, 1967; Larsen *et al.*, 1966; Mian y Percival, 1973) hasta aquellas con fucano sulfatado relativamente puro con un bajo contenido de ácidos urónicos (Hogsett y Quatrano, 1975).

Aunque probablemente todas las algas cafés contienen algo de fucoidán, el contenido y composición en las diferentes especies es variable (Chang-Hu *et al.*, 2001). Este polisacárido se encuentra en el tejido intercelular o en la matriz mucilaginosa de las algas; se le atribuye la función de proteger a la planta de la desecación y puede participar en las funciones de intercambio iónico de las mismas (Percival y McDowell, 1967; Painter, 1983; Lobban y Harrison, 1994).

En concordancia con la función que el fucoidán desempeña en las macroalgas, una mayor proporción de este compuesto, ocurre en aquellas especies de algas pardas que habitan la parte superior de la zona intermareal y que pasan el mayor tiempo fuera del agua (Black, 1954); de esta manera, las especies más prominentes que contienen fucoidán, pertenecen al grupo de las fucales (Painter, 1983).

Se considera al fucoidán como un polisacárido que es altamente heterogéneo, por lo tanto su composición puede variar de acuerdo a la fuente de la cual se obtiene (Black, 1954). En este sentido, entonces, es posible que la composición del fucoidán, en las diferentes especies, siga un patrón de síntesis particular, el cual puede ser afectado por factores de tipo biológico (Mian y Percival 1973; Hogsett y Quatrano 1975), ambientales (foto-periodo, periodo de exposición, temperatura, etc.) (Black *et al.*, 1952) o bien por efecto del método de obtención empleado (Mabeau *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2005). Es por ello, que es necesario conocer los componentes moleculares de este tipo de polisacáridos de las diferentes macroalgas y sus variaciones; así en función a su composición, orientar estos compuestos hacia la aplicación más apropiada.

En lo que respecta al ulván de algas verdes, similar a lo que ocurre para el fucoidán, este, también es un polisacárido complejo que está formado por cantidades variables

de ramnosa, xilosa, glucosa, ácido glucurónico e idurónico y grupos hemiéster sulfato (Percival y McDowell, 1967; Ray y Lahaye, 1995; Lahaye, 2001).

La investigación en busca de sustancias farmacológicamente activas en macroalgas, en particular de los polisacáridos sulfatados de algas pardas (fucoidán) y verdes (ulván), el punto de partida debe iniciar con un monitoreo de flora específica, donde se analizan especies que guarden cierta similitud con aquellas que contienen compuestos con actividad biológica comprobada (Chapman y Chapman, 1980; Blunden *et al.*, 1981; Ragan, 1984; Pesando y Caram, 1984). Posteriormente, de aquellas especies que resulten más interesantes por el contenido de sus compuestos activos, entonces el paso a seguir es profundizar más acerca de las características químicas de éstos compuestos.

En este estudio se hace una contribución al conocimiento de los polisacáridos sulfatados (PS) de especies de algas pardas y verdes características del Pacífico templado mexicano. Para cumplir con este propósito, este estudio se presenta en cuatro capítulos.

En el capítulo I, se evaluaron diferentes condiciones de extracción, para definir el método más adecuado en función del rendimiento, contenido de grupos sulfato y características de solubilidad del producto.

En el Capítulo II se realizó un monitoreo de especies de macroalgas características de la región incluyendo algas pardas y verdes, se reportan los rendimientos y características de los PS de las diferentes macroalgas.

Una vez definidas las características generales de los polisacáridos sulfatados presentes en las diferentes especies en el estudio, en el Capítulo III, se hace énfasis en los polisacáridos del alga parda *Silvetia compressa*, especie más afín desde el punto de vista taxonómico a *Fucus vesiculosus*, fuente original del fucoidán. Se evalúa el rendimiento y características del fucoidán de esta especie, en función de la localidad

geográfica, tipo de tejido y el efecto de la temperatura en que la planta crece. Además, se evalúa la heterogeneidad de los polisacáridos obtenidos de esta especie. Finalmente en el Capítulo IV, para definir las características de los polisacáridos sulfatados de algas verdes (Ulvales), se describen los PS del alga verde *U. clathrata*, en función de su solubilidad en diferentes medios de extracción.

HIPÓTESIS

1. Las macroalgas son una fuente importante de polisacáridos; en particular en las algas pardas y verdes del orden Ulvales, los polisacáridos solubles presentes, son polisacáridos sulfatados del tipo no galactanos (PSNG). En las macroalgas del Pacífico templado mexicano, es posible que el contenido y composición de los PSNG, varíe entre especies, sin embargo pueden presentar similitudes en relación a su familia taxonómica.

2. A los polisacáridos sulfatados en las algas pardas, se les atribuyen propiedades de intercambio iónico y en el alga es material que evita la desecación; acorde a estas funciones, ocurren variaciones en la composición de PS en función de:

- a) Factores biológicos (tipo de tejido: apical vs basal).
- b) Físicos (localidad geográfica y temperatura en que se desarrollan).

3. Los polisacáridos solubles del alga parda *S. compressa*, están formados por una mezcla heterogénea de moléculas de composición diferente. Las diferentes macromoléculas que constituyen el polisacárido total, tienen diferentes propiedades de solubilidad; entonces, es posible separar por métodos químicos y cromatográficos, fracciones de composición diferente.

4. Los polisacáridos solubles del alga verde *Ulva clathrata*, son polisacáridos sulfatados no galactanos del tipo ulván, formados por una mezcla de moléculas, cuya composición depende del método de extracción empleado (Capítulo IV).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento sobre especies de macroalgas de importancia en el Pacífico templado mexicano, en función del contenido y composición de los polisacáridos sulfatados presentes y conocer el efecto de factores ambientales en su composición.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el método de extracción óptimo de polisacáridos sulfatados en algas pardas y verdes en función del rendimiento y contenido de grupos hemiéster sulfato.
2. Evaluar el contenido y características de los polisacáridos sulfatados de macroalgas pardas y verdes de la región.
3. Evaluar la composición y características de los polisacáridos sulfatados no galactanos (PSNG) de *Silvetia compressa* en función de la temperatura en que crecen, edad de la planta y localidad geográfica.
4. Mediante técnicas químicas y espectroscópicas, evaluar la heterogeneidad de los PSNG del alga parda *Silvetia compressa*.
5. Caracterizar los polisacáridos sulfatados del alga verde *Ulva clathrata* en función de sus características de solubilidad.

CAPÍTULO I

OBTENCIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS NO GALACTANOS

Índice

	página
I.1 Introducción.....	13
I.2 Hipótesis.....	16
I.3 Objetivos.....	17
I.3.1 Objetivo general.....	17
I.3.2 Objetivos particulares.....	17
I.4 Materiales y métodos.....	17
I.4.1 Materias primas.....	17
I.4.2 Extracción de polisacáridos sulfatados.....	20
I.4.3 Análisis de sulfatos.....	21
I.4.4 Pruebas estadísticas.....	21
I.5 Resultados.....	22
I.6 Discusión.....	26

I.1 INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos son de las moléculas biológicas más abundantes en la naturaleza; de acuerdo a algunas estimaciones cada año, por el proceso de biosíntesis, se producen cerca de 104 petagramos por año (Field, 1998). Estos compuestos, constituyen la ruta central en que la energía del sol es capturada y transformada en formas que pueden ser utilizadas por el hombre y otros animales (ej. almidón, celulosa).

En las plantas, los carbohidratos desempeñan diferentes funciones biológicas, entre estas, destacan su funcionamiento como reserva energética y material de sostén (estructural). En particular, en los vegetales marinos, el papel principal de los carbohidratos es su función estructural (Kloareg y Quatrano 1988; Mabeau y Kloareg, 1997). Forman parte de la pared celular, así como de la matriz inter y extracelular, donde, generalmente se encuentran formando una mezcla compleja, interaccionando con diferentes polisacáridos y proteínas, de forma tal, que le dan a la planta, las características estructurales necesarias para enfrentar las exigencias del medio ambiente marino (Dawes, 1991).

La pared celular de las algas marinas, es un organelo que protege a la célula y le proporciona su forma y estructura. Se compone de dos fases, una cristalina y una amorfa; la primera, está formada por polisacáridos de tipo fibroso, los cuales son polisacáridos de cadena lineal, neutros e insolubles en agua; mientras que en la fase amorfa o matriz encontramos polisacáridos que generalmente poseen grupos iónicos y que constituyen a los polisacáridos ácidos; éstos, son solubles en agua e imparten ciertas características de viscosidad (McCandless, 1981).

Una diferencia de las macroalgas con respecto a las plantas superiores es que en las algas marinas, prevalecen los componentes de la matriz sobre los componentes esqueléticos (polisacáridos polianiónicos sobre los polisacáridos neutros) (McCandless, 1981; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988).

La composición de los polisacáridos de la matriz, es mucho más compleja que los polisacáridos fibrosos y en general difieren para cada división algal. En particular, los polisacáridos de la matriz se caracterizan por su carácter polianiónico, propiedad debida a la presencia de grupos carboxilo (COO^-), como en alginatos de algas pardas, o grupos hemiéster sulfato (OSO_3^-) presentes en los galactanos sulfatados de algas rojas (agar y carragenanos) (Painter, 1983, Craigie, 1990) o bien a la presencia de ambos, en polisacáridos más complejos como los fucanos de algas pardas y ulvanos y

galactanos de algas verdes (Percival y McDowell, 1967; Lahaye y Robic, 2007). Los polisacáridos de la matriz son estructuralmente más complejos y generalmente interaccionan entre sí y con otras biomoléculas; de esta manera, se encuentran formando un complejo con los polisacáridos fibrosos y proteínas de la pared celular (Percival, 1979; McCandless, 1981; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988).

Otra característica distintiva de las macroalgas respecto a plantas terrestres es la presencia de polisacáridos sulfatados, mientras que las plantas terrestres carecen de ellos (Kloareg y Quatrano, 1988, Lobban y Harrison, 1994).

El conocimiento de los polisacáridos algales y sus características fisicoquímicas, particularmente en su estado nativo, es aún muy limitado y por lo general se describen en función de sus características de solubilidad y unidades componentes (Kloareg y Quatrano, 1988; Lobban y Harrison, 1994). Como se mencionó antes, los polisacáridos fibrosos son neutros e insolubles, mientras que los de la matriz, debido a sus características iónicas, son solubles en agua; éstos últimos frecuentemente son polielectrolitos, como en el caso de las algas pardas, donde el alginato, es el polisacárido principal, y dentro de este polisacárido, se encuentra inmerso el fucoidán sulfatado (Painter, 1983, Kloareg y Quatrano, 1988).

Algo similar ocurre en las algas verdes, donde el ulván sulfatado, que se encuentra en la matriz, interacciona con xiloglucanos y glucuronanos solubles en álcali (Lahaye y Robic, 2007).

Basado en lo expuesto en párrafos anteriores, se infiere que los sistemas biológicos son complejos y los diferentes componentes interaccionan entre si para cumplir con su función dentro de la planta. Entonces, la obtención de los polisacáridos sulfatados, implica su separación del complejo en que se encuentran dentro de la matriz algal; en principio, se debe buscar obtener los mejores rendimientos, la mayor pureza y la menor degradación del polisacárido objetivo; se debe minimizar la extracción colateral de otros componentes que no sean parte del polisacárido, pero que se encuentran en la misma macroalga. Esto se puede lograr aprovechando las características particulares de

solubilidad y o diferentes interacciones con agentes quelantes de cada sistema de polisacáridos presentes (Rinaudo, 2006).

Este trabajo está enfocado en obtener un método de extracción que provea el mejor rendimiento y características de los polisacáridos sulfatados no galactanos (PSNG), en este grupo se encuentra el fucoidán de algas pardas y el ulván de algas verdes del orden Ulvales. Para este propósito, como materia prima para realizar la evaluación de la extracción, se empleó el alga parda del orden Fucales *Silvetia compressa*, con esta materia prima, se llevaron a cabo diferentes pruebas de extracción utilizando diferentes medios acuosos (agua, ácido, álcali y una solución de calcio) y diferente temperatura de extracción.

I.2 HIPÓTESIS

En las algas pardas, coexisten polisacáridos con diferentes grupos iónicos, los cuales les imparten propiedades de solubilidad diferentes. Mediante el uso de diferentes medios de extracción y temperaturas, es viable modificar positivamente el rendimiento y contenido de grupos sulfato de los polisacáridos obtenidos.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 OBJETIVO GENERAL

Optimizar el método de extracción de polisacáridos sulfatados en macroalgas, en función de su rendimiento, el contenido de grupos hemiester sulfato y sus características de solubilidad.

I.3.2 OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar las diferencias en rendimiento y solubilidad de los polisacáridos sulfatados en diferentes medios acuosos (ácido, neutro y alcalino) variando la temperatura de extracción.

I.4 MATERIALES Y MÉTODOS

I.4.1 MATERIAS PRIMAS

Durante marzo de 2007, en el intermareal superior de la localidad de Punta Baja, en El Rosario, B. C. (Fig. I.1), se colectó una muestra del alga parda del orden Fucales *Silvetia compressa* (Fig. I.2). La muestra de aproximadamente 3 kg frescos, consistió de estipes de al menos 15 plantas diferentes en la zona en que esta especie forma bandas paralelas a la costa (Fig. 1.3). La muestra, se trasladó al laboratorio en fresco dentro de una hielera. Se secó con corriente de aire a 45°C por 72 horas. La muestra seca, se molió en molino de cuchillas Willey, hasta un tamaño de partícula ≤ 40 mesh (0.42 mm); para su análisis, se conservó seca y molida en recipiente cerrado.

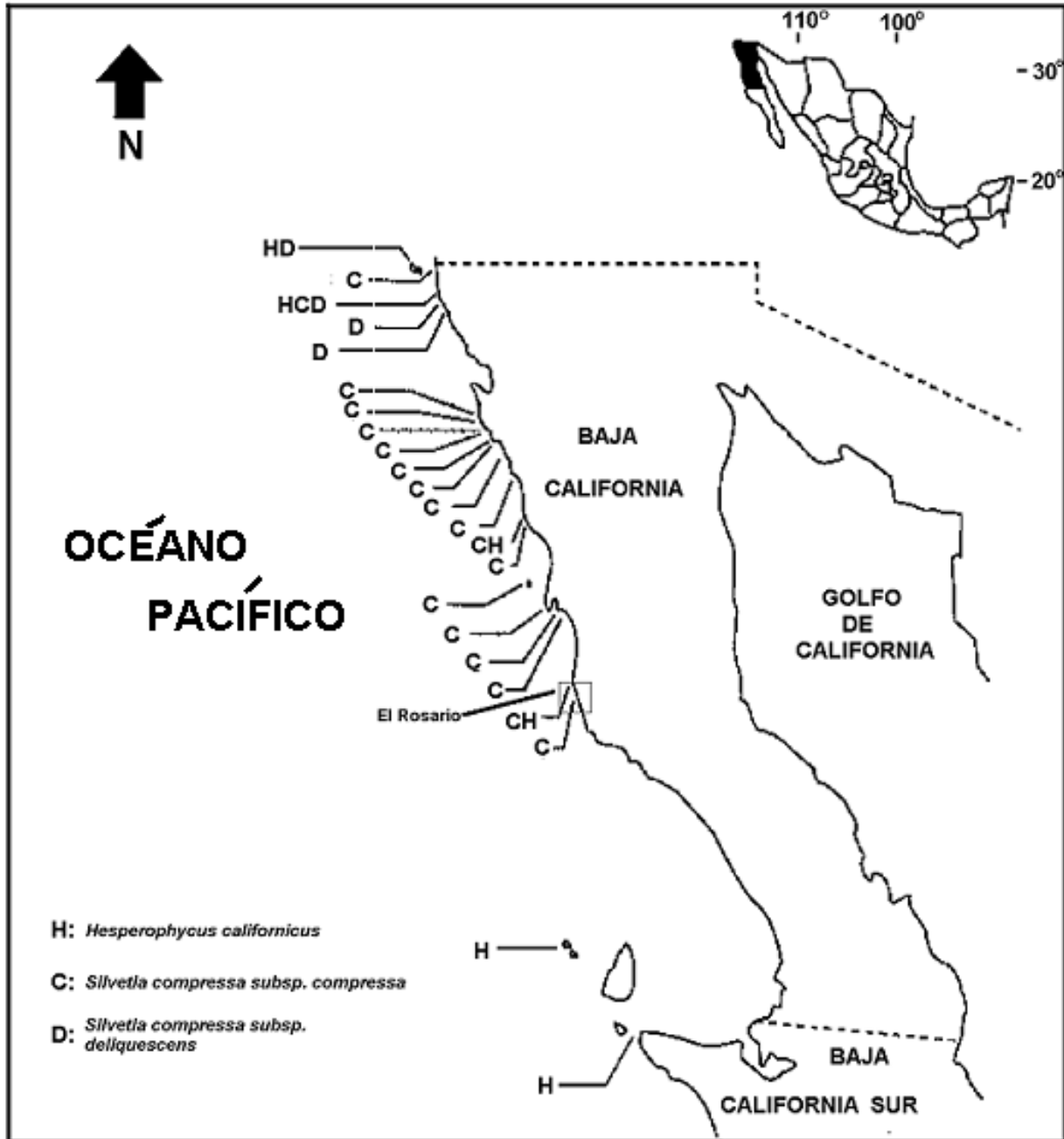


Figura 1.1 Distribución de las especies de algas pardas de la familia Fucaceae en la costa del Pacífico de México. *Hesperophycus californicus*, *Silvetia compressa* subsp. *compressa* y *S. compressa* subsp. *deliquescens* (modificado de Aguilar-Rosas *et al.*, 2002). La localidad de colecta de los ejemplares de este estudio es El Rosario, B. C. .



Figura 1.2 Aspecto general de un talo de *Silvetia compressa* (escala 2 cm) (tomado de Aguilar-Rosas *et al.*, 2002).



Figura 1.3 Pradera intermareal de macroalgas en Punta Baja (El Rosario, B. C.); donde se muestra la distribución característica en bandas paralelas a la costa, de las especies intermareales en el Pacífico templado mexicano.

I.4.2 OBTENCIÓN DE POLISACÁRIDOS SOLUBLES

El procedimiento consistió en someter muestras del alga parda *S. compressa*, seca y molida ($\phi \leq 1$ mm) a 4 medios acuosos distintos (agua, HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M / CaCl₂ y CaCl₂ 0.1M) cada uno sometido a 3 temperaturas de extracción (20, 60 y 80°C).

Cada tratamiento fue como sigue:

Para cada uno de los medios, se pesaron 3 g de alga seca y molida ($\phi \leq 40$ mesh), se colocaron en 45 mL de la solución acuosa respectiva (agua, HCl 0.1 M, NaOH 0.1 M / CaCl₂ y CaCl₂ 0.1M) y se extrajo por 120 minutos bajo agitación en baño maría, a 3 temperaturas (20, 60 y 80°C). La solución resultante se centrifugó por 5 minutos a 1,500 rpm, se colectó el sobrenadante, mientras que el residuo sólido, se re-extrajo por

60 minutos adicionales con 30 mL del mismo medio y temperatura; se centrifugó y el sobrenadante, se combinó con el obtenido en la primera extracción. La solución resultante, se filtró a vacío empleando tierra de diatomeas; se le adicionó NaCl sólido, hasta lograr una concentración de 0.1 M y se precipitó con 3 volúmenes de etanol concentrado. Se dejó en reposo por un mínimo de 60 minutos y posteriormente, se centrifugó a 1,500 rpm por 10 minutos; el sobrenadante (alcohol-agua) se decantó y para eliminar sales y humedad del precipitado, se lavó secuencialmente, 2 veces con 15 mL de etanol al 70% y 1 vez con etanol concentrado por 30 minutos cada vez. Se secó a 60°C en estufa de convección por 72 h y se pesó. Cada procedimiento se hizo por triplicado.

I.4.3 ANÁLISIS DE SULFATOS

Los grupos hemiéster sulfato en el extracto seco, se cuantificaron por medio del método turbidimétrico de BaCl₂-Gelatina, usando K₂SO₄ como estándar (Tabatabai, 1974, modificado por Craigie y Wen, 1984).

I.4.4 PRUEBAS ESTADÍSTICAS

Cada factor, rendimiento y contenido de sulfatos, se procesaron mediante el análisis de varianza (ANAVA) de dos factores; el medio de extracción con 3 niveles (agua, HCl 0.1M y CaCl₂ 0.1M) y la temperatura con 3 niveles (20, 60 y 80°C), previamente los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homocedasticidad de Bartlett (Zar, 1999). En caso de obtener diferencias significativas ($P < 0.05$), para establecer la diferencia de medias entre la interacción de factores, se aplicó una prueba a posteriori de comparaciones múltiples de Tukey (Zar, 1999).

I.5 RESULTADOS

El rendimiento obtenido con los diferentes medios y temperaturas probados, fluctuó de 3.15% a 15.49% en base seca (Tabla I.1). En todos los casos, se observó que el medio de extracción y la temperatura influyen en el rendimiento. En general el medio ácido y el agua, produjeron mejores rendimientos, que el medio alcalino y el medio con sales de calcio. Por otra parte, se obtuvo una correlación positiva entre la temperatura y el rendimiento obtenido para los diferentes medios probados (Tabla I.3.1). El menor rendimiento (3.15% en base seca) correspondió a la menor temperatura de extracción (20°C), mientras que el máximo correspondió a 80°C en ambos casos fue para la extracción con HCl (Tabla I.1).

Se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de polisacáridos solubles (% en base del alga seca) y su contenido de sulfatos (% en base del polisacárido seco), en función del medio de extracción y la temperatura ($P = 0.05$) e interacción de factores medio x la temperatura de extracción (M x T).

El contenido de sulfatos evaluado en los extractos secos, fluctuó de 14.14% a 28.31%, donde los mayores contenidos, fueron para la solución de CaCl_2 para todas las temperaturas probadas. En la interacción de factores medio y temperatura, el mejor contenido de sulfatos correspondió a la temperatura de 60°C para el CaCl_2 ; mientras que el mínimo se obtuvo a la menor temperatura con HCl no ocurrieron diferencias significativas a 60 y 80°C para los medios de extracción: Agua y HCl (Tabla I.2 y I.3.2C). Por otra parte, en relación a la temperatura, el contenido de sulfatos, varió para los diferentes medios; sin embargo, el comportamiento en todos los medios, de 20 a 60°C, tuvo una correlación positiva con la temperatura; y posteriormente ocurre una disminución al incrementar la temperatura a 80°C. La temperatura con el mejor rendimiento de sulfatos fue 60°C, mientras que a 20 y 80°C no mostraron diferencias significativas (Tabla I.3.2B).

Un hecho relevante se observó en relación a la solubilidad de los polisacáridos; aquellos obtenidos con sales de calcio, presentaron mayor dificultad para disolverse para su análisis.

Tabla I.1 Rendimiento de polisacáridos obtenido del alga parda *Silvetia compressa* en diferentes medios (Agua, HCl, NaOH/CaCl₂, CaCl₂) y temperaturas (20, 60 y 80°C).

Medio	Temperatura de extracción (°C)		
	20	60	80
(% en base seca ± D. Estándar)			
Agua	5.77 ± 0.44	6.36 ± 0.66	11.61 ± 0.53
HCl 0.1 N	3.15 ± 0.06	13.69 ± 0.42	15.49 ± 0.78
NaOH 0.1 M / CaCl₂	5.09 ± 0.29	5.84 ± 0.67	6.46 ± 1.21
CaCl₂ 0.1M	3.70 ± 0.18	3.83 ± 0.37	8.56 ± 0.29

Tabla I.2 Contenido de sulfatos en los polisacáridos del alga parda *Silvetia compressa* extraídos en diferentes medios y temperaturas.

Medio	Temperatura de extracción (°C)		
	20	60	80
(% ± D. Estándar)			
Agua	16.12 ± 0.23	18.02 ± 0.47	17.34 ± 0.39
HCl 0.1 N	14.14 ± 1.14	17.19 ± 1.15	15.75 ± 0.42
CaCl₂ 0.1M	22.58 ± 1.40	28.31 ± 1.48	18.91 ± 0.95

Tabla I.3.1 Comparación múltiple a posteriori en el rendimiento de polisacáridos, en función del medio (A), temperatura (B) de extracción y (C) ambos factores (Tukey para diferente n), donde las medias que no comparten las mismas letras (minúsculas), son significativamente diferentes ($P < 0.05$) La numeración en los encabezados representa a grupos homogéneos.

A					
Medio	Rend Promedio%	1	2	3	Dif.
CaCl₂	5.94	****			c
H₂O	7.91		****		b
HCl	11.25			****	a

B					
Temperatura	Rend Promedio%	1	2	3	Dif.
20	4.49	****			c
60	7.67		****		b
80	11.63			****	a

C									
Temperatura °C	Medio	Rend Promedio%	1	2	3	4	5	6	Dif.
20	HCl	3.15	****						e
20	CaCl ₂	3.70	****	****					ed
60	CaCl ₂	3.83	****	****					ed
20	H ₂ O	5.77		****	****				d
60	H ₂ O	6.36			****				cd
80	CaCl ₂	8.56						****	c
80	H ₂ O	11.61				****			b
60	HCl	13.69				****	****		ab
80	HCl	15.49					****		a

Tabla I.3.2 Comparación múltiple a posteriori en el contenido de sulfatos en función del medio (A), temperatura (B) de extracción y ambos factores (C) (Tukey para diferente n), donde las medias que no comparten las mismas letras (minúsculas), son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

		A		
Medio	% SO ₃ Promedio	1	2	Diferencias
HCl	16.03	****		b
H ₂ O	17.16	****		b
CaCl ₂	23.44		****	a

		B		
Temperatura	% SO ₃ Promedio	1	2	
20	17.61	****		b
80	17.84	****		b
60	21.17		****	a

				C					
Temperatura °C	Medio	% SO ₃ Promedio	Grupos homogéneos					Diferencias	
			1	2	3	4	5		
20	HCl	14.14			****			e	
20	H ₂ O	16.12	****		****			ed	
80	HCl	16.77	****	****	****			d	
60	HCl	17.19	****	****				cd	
80	H ₂ O	17.34	****	****				cd	
60	H ₂ O	18.02	****	****				cd	
80	CaCl ₂	19.43		****				c	
20	CaCl ₂	22.58				****		b	
60	CaCl ₂	28.31					****	a	

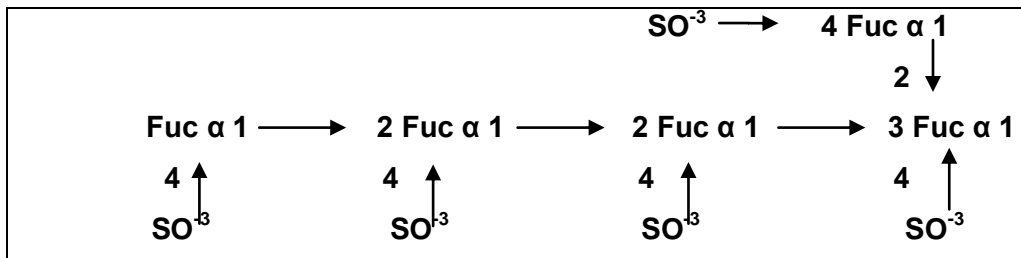
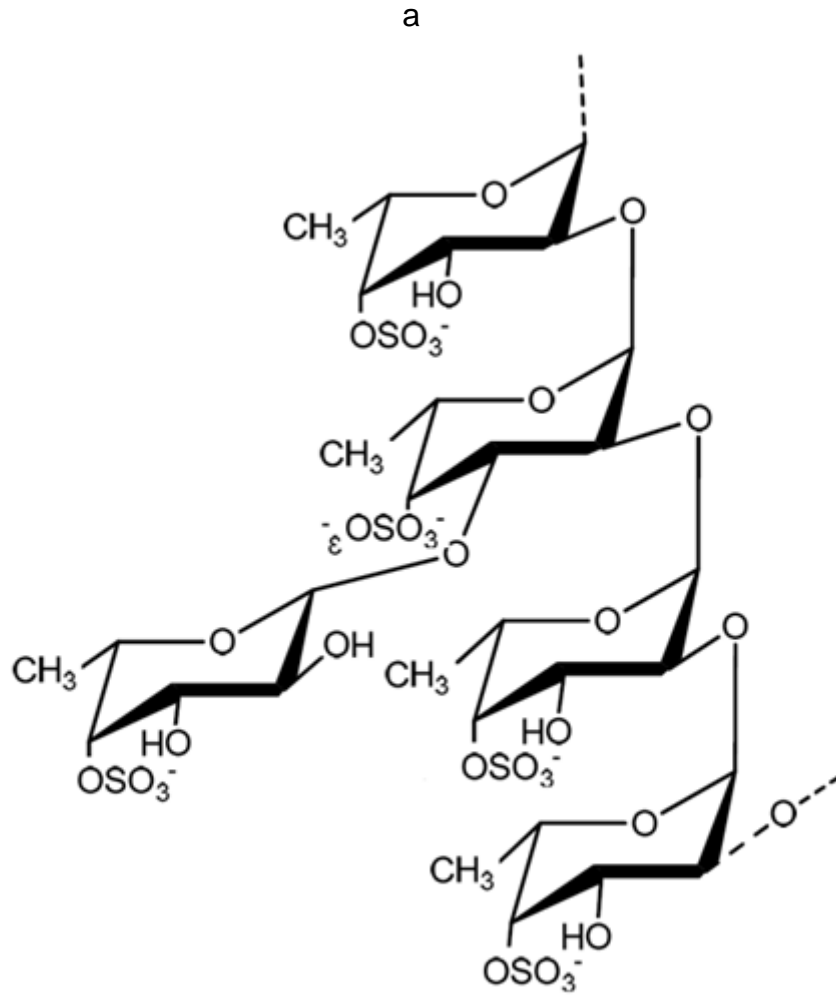
I.6 DISCUSIÓN

Los polisacáridos sulfatados (PS) de las algas pardas se encuentran inmersos en una matriz heterogénea, interaccionan con otros sistemas de polisacáridos con características estructurales y de solubilidad diferentes, algunos neutros como laminarén, celulosa y hemicelulosa y otros con características iónicas como el alginato (Painter, 1983; Lobban y Harrison, 1994). En este contexto, es posible que el fucoidán tenga un papel importante en la organización de la pared celular algal (Kloareg y Quatrano, 1988; Bisgrove y Kropf, 2001) y pudiera estar implicado en los enlaces cruzados entre alginato y celulosa (Mabeau *et al.*, 1990). Esto hace necesario que el método de extracción que se adopte; deba en lo posible, ser selectivo, capaz de extraer solo los PS de esta matriz, sin extraer polisacáridos con diferente grupo funcional.

Algunos polisacáridos de bajo peso molecular, tanto neutros, como iónicos, pueden solubilizarse casi con cualquier medio acuoso; sin embargo, los polisacáridos iónicos que contienen ácidos urónicos, como los alginatos, son insolubles a pH ácido y en la presencia de metales divalentes, como el calcio, estroncio, bario, etc. (Smidsrod, 1973; Rinaudo, 2007). En este sentido, se espera que el medio ácido y las sales de calcio empleadas en la extracción impidan la solubilización de los alginatos, ya que éste es un medio más selectivo para la obtención de los polisacáridos sulfatados de algas pardas.

Los métodos tradicionales, empleados en la obtención comercial de fucoidán, generalmente implican extracciones a temperaturas mayores a 50°C y pueden realizarse en agua (Percival y Ross, 1950) o en medio ácido (Black, 1954; Larsen, 1978; Nishino *et al.*, 1989; Patankar *et al.*, 1993; Ponce *et al.*, 2003). El medio empleado en la extracción, afecta tanto el rendimiento, así como la composición del producto extraído; esto quedó demostrado con los estudios de Percival y Ross (1950) que analizan los polisacáridos extraídos en agua, del alga parda *Fucus vesiculosus*, proponen la estructura para la molécula del fucoidán formada por un núcleo de α 1-2 fucosa, con ramificaciones de fucosa en posición 3 (Fig. 1.4A); sin embargo Patankar *et al.*, (1993), mediante una extracción ácida, proponen una estructura diferente a la

anterior, donde establecen, que la posición de enlace para la molécula de fucoidán se encuentra en α (1-3) fucosa con ramificaciones de fucosa en posición 2 y 4 (Fig.1.4B).



b

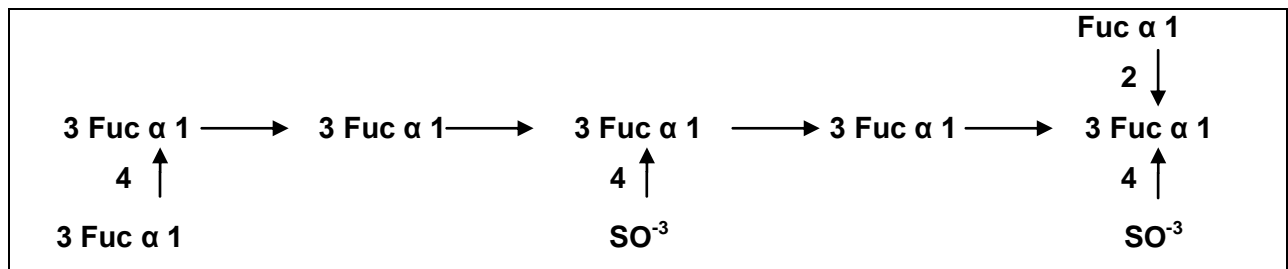
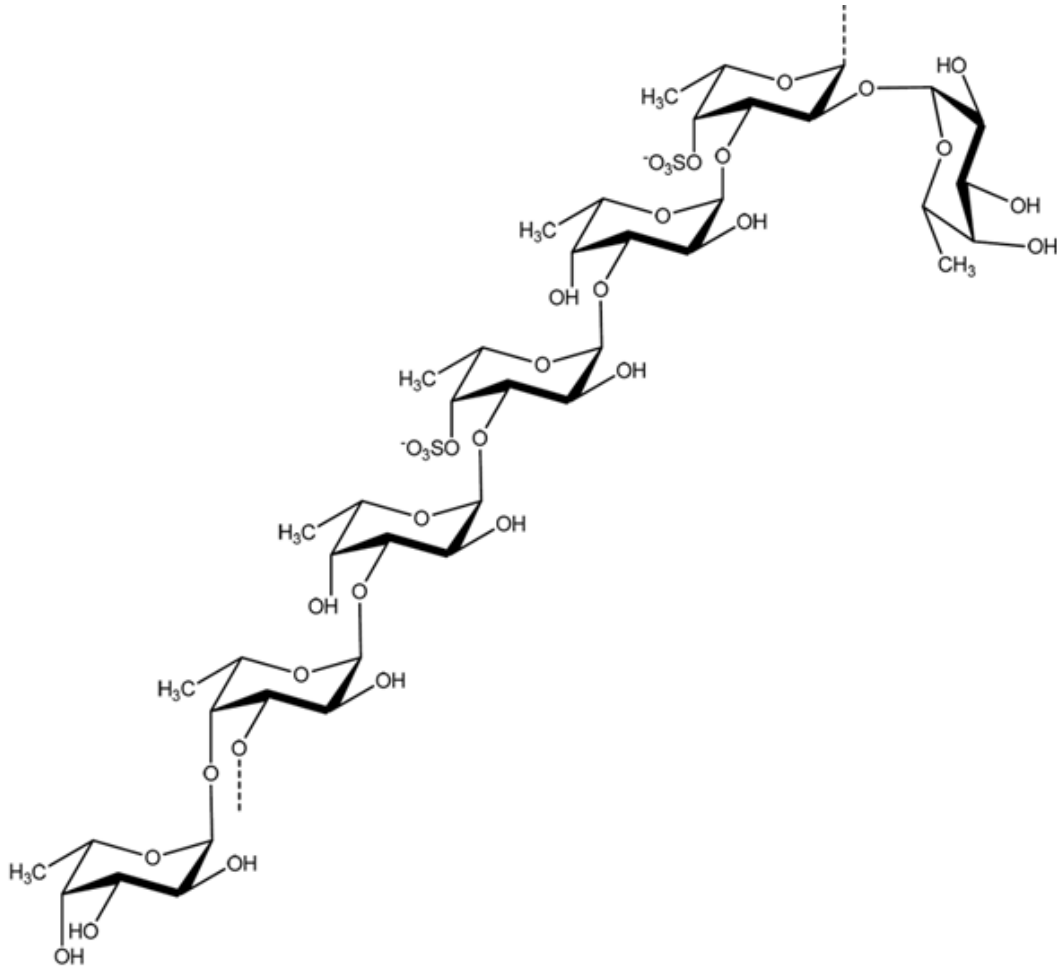


Figura 1.4 Modelo de la estructura original propuesta para el fucoidán (a) (Percival y Ross, 1950) y (b) nuevo modelo propuesto (Patankar *et al.*, 1993).

En concordancia con lo expresado en párrafos anteriores, los resultados obtenidos en este estudio, muestran que tanto el medio empleado en la extracción (pH, sales. etc.),

así como la temperatura, influyeron en la eficiencia de extracción de los polisacáridos solubles y en su composición. Los polisacáridos ácidos de la matriz celular algal, debido a la presencia en estos de diferentes grupos iónicos (carboxilo o hemiester sulfato), son extremadamente solubles en medios acuosos. Sin embargo, existen interacciones internas (puentes de hidrógeno) entre los diferentes componentes de la matriz (celulosa, hemicelulosa, polisacáridos solubles y proteínas) que mantienen una estructura definida, por lo que la remoción en este sistema de un polisacárido en particular estará influenciada por las condiciones de extracción empleadas.

En particular, en la pared celular de las algas algal los polisacáridos que poseen grupos hemiester sulfato interaccionan con polisacáridos como los alginatos en algas pardas, además de otros polisacáridos con características neutras como celulosa y hemicelulosa. En este sistema, cuando el pH disminuye por debajo de 3.2 los grupos carboxilo de los ácidos urónicos se protonan y se insolubilizan (Haug, 1964; Rinaudo, 2006; Robic, 2008). Sin embargo, a ese pH los grupos sulfato permanecen aún ionizados y por lo tanto, permite la dispersión de agregados donde estos polisacáridos participan, de esta manera los polisacáridos sulfatados se solubilizan mientras las moléculas de alginato y celulosa permanecen insolubles.

En contraste, un incremento del pH promueve interacciones iónicas entre carboxilos y grupos sulfato, debilita los puentes hidrógeno y así, la extracción ya no es selectiva, ésto dá como resultado, la obtención de una mezcla de polisacáridos donde ocurren ambos grupos funcionales (Rinaudo, 2006; Robic, 2008).

En este estudio en el procedimiento donde la extracción se realizó a pH alcalino se incluyó una sal de calcio (CaCl_2), el cual como ya se mencionó, afecta la solubilidad de los sistemas de polisacáridos presentes y no solo a los ácidos urónicos (Rinaudo, 2006). Esto explica los bajos rendimientos obtenidos en los tratamientos donde estuvo presente el calcio.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos con calcio presentaron un contenido mayor de sulfatos (Tabla I.2); sin embargo, para éste medio, el rendimiento del extracto crudo fue menor; además el producto final seco fue poco soluble, lo que dificultó su caracterización posterior.

A excepción de la extracción a 20°C, la extracción en medio ácido, resultó en rendimientos mayores de polisacáridos solubles, junto con esto, el contenido de grupos sulfato llegó a su máximo rendimiento en proporción del polisacárido extraído tal como se muestra en la Tabla I.2.

Respecto a la temperatura de extracción, es evidente que afecta el rendimiento y composición. Si bien las bajas temperaturas (20°C) extrajeron en proporción polisacáridos con mayor contenido de sulfatación, sus rendimientos fueron inferiores; en contraste, la mayor temperatura empleada (80°C) resultó en mayores rendimientos del polisacárido. Sin embargo, puede observarse en la Tabla I.2, para todos los casos (Excepto en agua) que el contenido de sulfatos disminuyó para la temperatura mayor (80°C), esto sugiere que el incremento observado en el rendimiento a dicha temperatura, se deba a la extracción colateral de otros polisacáridos, probablemente azúcares neutros provenientes de la celulosa y hemicelulosas o incluso ácidos urónicos, componentes de la cadena de alginatos.

En concordancia con lo expresado, Ponce *et al.*, (2003) reportaron para *Adenocystis utricularis* extraído a temperatura ambiente, la obtención de un fucoidán compuesto de fucosa, galactosa y hemiéster sulfato (galactofucán), mientras que con la extracción a 70°C, la composición del polisacárido obtenido cambió, donde se compone ahora principalmente por fucosa, acompañado por otros monosacáridos como manosa, glucosa, xilosa, ramnosa, galactosa y presenta cantidades significantes de ácidos urónicos y baja proporción de ester de sulfato (“uronofucoidán”); entonces, de lo anterior, podemos inferir que tanto el medio, como la temperatura empleada, afectan el contenido y la composición de los polisacáridos sulfatados.

La temperatura se correlaciona positivamente con el rendimiento; sin embargo tal como se describió en el párrafo anterior, la temperatura debe elegirse en primera instancia, que favorezca el mejor rendimiento, pero también que asegure la mayor pureza del producto y en lo posible evitar la degradación térmica, que pudiera presentarse a temperaturas extremas.

Las extracciones obtenidas con CaCl_2 y agua tuvieron alto contenido de sulfatos, sin embargo los rendimientos fueron bajos (excepto agua a 80°C), además los extractos obtenidos con dichos medios, una vez secos, se dificultó su solubilización posterior en agua, por tal motivo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio y basado en los antecedentes, de que la mayoría de los procesos comerciales reportados emplean medios ácidos para la obtención de fucoidán, se considera que la extracción en medio ácido a 60°C , condición en la que el extracto crudo tuvo los mejores rendimientos; aunque éste tratamiento no correspondió al mayor contenido de sulfatos; la combinación de rendimiento y % de sulfatos encontrado, nos muestra una mayor selectividad que el tratamiento con el mismo medio a una temperatura mayor.

CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO Y COMPOSICIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS NO GALACTANOS DE ESPECIES DE MACROALGAS ABUNDANTES EN BAJA CALIFORNIA.

II.1 Introducción.....	33
II.2 Hipòtesis.....	35
II.3 Objetivos.....	36
II.3.1 Objetivo general.....	36
II.3.2 Objetivos particulares.....	36
II.4 Materiales y métodos.....	36
II.4.1 Colecta de material biológico.....	36
II.4.2 Extracción y purificación de polisacáridos sulfatados.....	
solubles	41
II.4.3 Caracterización química.....	41
II.4.4 Cuantificación directa de fucoidán.....	42
II.4.5 Razón molar de componentes.....	46
II.5 Resultados.....	43
II.5.1 Rendimiento.....	43
II.5.2 Contenido de sulfatos.....	44
II.5.3 Polisacáridos sulfatados de algas pardas (fucoidán).....	45
II.5.4 Polisacáridos sulfatados de algas verdes (ulván).....	45
II.5.5 Infrarrojo.....	46
II.5.6 Razón molar de componentes.....	56
II.6 Discusión.....	55

II.1 INTRODUCCIÓN

Las macroalgas se caracterizan por contener una gran diversidad de polisacáridos de reserva y estructurales, los cuales, similar a como ocurre con los pigmentos, los sistemas de polisacáridos son característicos de grupos taxonómicos mayores (Lobban y Harrison, 1994); de tal manera que los sistemas de polisacáridos en las algas marinas, pueden usarse como marcadores taxonómicos (Parker, 1970; Domozych *et al.*, 1980).

Una de las características distintivas de las algas marinas respecto a plantas terrestres, en relación a los polisacáridos estructurales, es el hecho de que los polisacáridos de la matriz se encuentran en una mayor proporción que los polisacáridos fibrosos (celulosa y hemicelulosa) y la otra es la presencia de polisacáridos sulfatados (PS) los cuales están ausentes en plantas vasculares superiores (Quatrano y Stevens, 1976; McCandless, 1981; Kloareg y Quatrano, 1988; Cassaro and Dietrich, 1977; Yoon *et al.*, 2002).

En todas las divisiones de las algas marinas, se encuentra al menos un tipo de polisacárido sulfatado; donde, en algunos casos, pueden representar hasta el 40% del peso seco de la pared celular algal (Kloareg, 1984). Los polisacáridos sulfatados, se presentan en las tres principales divisiones algales; particularmente en algas rojas y algunas algas verdes (Codiales) los polisacáridos presentes son los galactanos sulfatados (PSG), mientras que en algas pardas los polisacáridos sulfatados están representados por los fucanos y en algas verdes (Ulvales) por los ramnanos sulfatados (ulvanos) (Percival y McDowell, 1967; Medcalf *et al.*, 1972; Percival 1978; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988; Lahaye 2001), para el propósito de este estudio, a este último grupo lo llamaremos polisacáridos sulfatados no galactanos (PSNG).

Mientras que en el mundo y en México existen numerosos estudios sobre especies de macroalgas y polisacáridos de importancia comercial, particularmente del tipo de

galactanos sulfatados, tales como, agares y carragenanos de algas rojas; contrasta con lo que ocurre con los polisacáridos sulfatados no galactanos, ya que su estudio es aún muy limitado; particularmente en las algas verdes, esto es todavía más crítico; debido al hecho de que hasta el momento no se obtienen productos de valor comercial de estas materias primas (Lahaye, 2001).

Sin embargo, en los últimos años, a nivel mundial, ha habido un interés creciente en el estudio de los polisacáridos sulfatados no galactanos de algas pardas y verdes, ya que a ellos, se les ha asociado a importantes propiedades bioactivas (Pereira *et al.*, 1999; Nagaoka *et al.*, 2000; Ponce *et al.*, 2003), tales como antivirales, antitumorales, antioxidantes y anticoagulantes, entre otras (Lee *et al.*, 1994; Ponce *et al.*, 2003; Lahaye y Robic, 2007; Mao *et al.*, 2006; Muñoz-Ochoa, 2006; Murillo-Álvarez, 2006; Reséndiz-Aguilar *et al.*, 2010).

La bioactividad que este tipo de compuestos presentan, está estrechamente ligada a sus características estructurales, tales como, grado de sulfatación, azúcares componentes y peso molecular, entre otros (Patankar *et al.*, 1993; Ruperez *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2006).

Los polisacáridos sulfatados no galactanos de las algas pardas, son polisacáridos cuya unidad estructural es la fucosa (fucanos sulfatados); éstos, se encuentran en todas las algas pardas; sin embargo, entre diferentes organismos, ocurren grandes variaciones en el tipo y composición de sus polisacáridos presentes.

En el caso de las algas verdes, los polisacáridos sulfatados no galactanos, su unidad estructural, es la ramnosa (ramnanos sulfatados). Mientras que los fucanos sulfatados se encuentran en todas las algas pardas, en las algas verdes los ramnanos sulfatados ocurren solo en ulvaes.

Sin embargo, no se puede decir, que estos polisacáridos son entidades homogéneas, ya que pueden mostrar diferencias en el contenido y composición entre las diferentes especies de macroalgas, en función de la división algal o por efecto de las

características ambientales en que éstas se desarrollan (Percival y McDowell, 1977; McCandless, 1981; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988; Craigie, 1990).

Con el propósito de contribuir a un mejor aprovechamiento futuro de las macroalgas en México, con productos de mayor valor agregado; en el presente estudio, se analizan especies de macroalgas características del Pacífico templado mexicano (ocho especies de faeofitas y cuatro de clorofitas); en ellas se evaluó el contenido y características químicas de los polisacáridos sulfatados que poseen.

II.2 HIPÓTESIS

Las divisiones algales, se caracterizan por poseer caracteres bioquímicos distintivos entre sí; tales como el sistema de pigmentos, polisacáridos de reserva y estructurales entre otros. En particular, los polisacáridos sulfatados que ocurren en las macroalgas, el contenido y composición entre las diferentes especies, está relacionado con su clasificación taxonómica.

II.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar especies de macroalgas representativas del pacífico templado mexicano en función del contenido y composición de los polisacáridos sulfatados-no galactanos (PSNG) presentes.

II.3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar las características de los polisacáridos sulfatados de algas pardas abundantes en las costas de Baja California.
- b) Evaluar las características de los polisacáridos sulfatados de algas verdes abundantes en las costas de Baja California.

II.4 MATERIALES Y MÉTODOS

II.4.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Durante marzo de 2006, en las localidades del Pacífico de Baja California, Eréndira, San Quintín y El Rosario y en el golfo de California en Bahía de los Ángeles (Figura II.1); se colectaron diferentes especímenes de macroalgas características de la región. Se abarcaron diferentes géneros, con diferente distribución en el perfil de mareas. La identificación de los organismos a nivel especie se realizó mediante claves de identificación y comparación con ejemplares de herbario (Facultad de Ciencias Marinas).

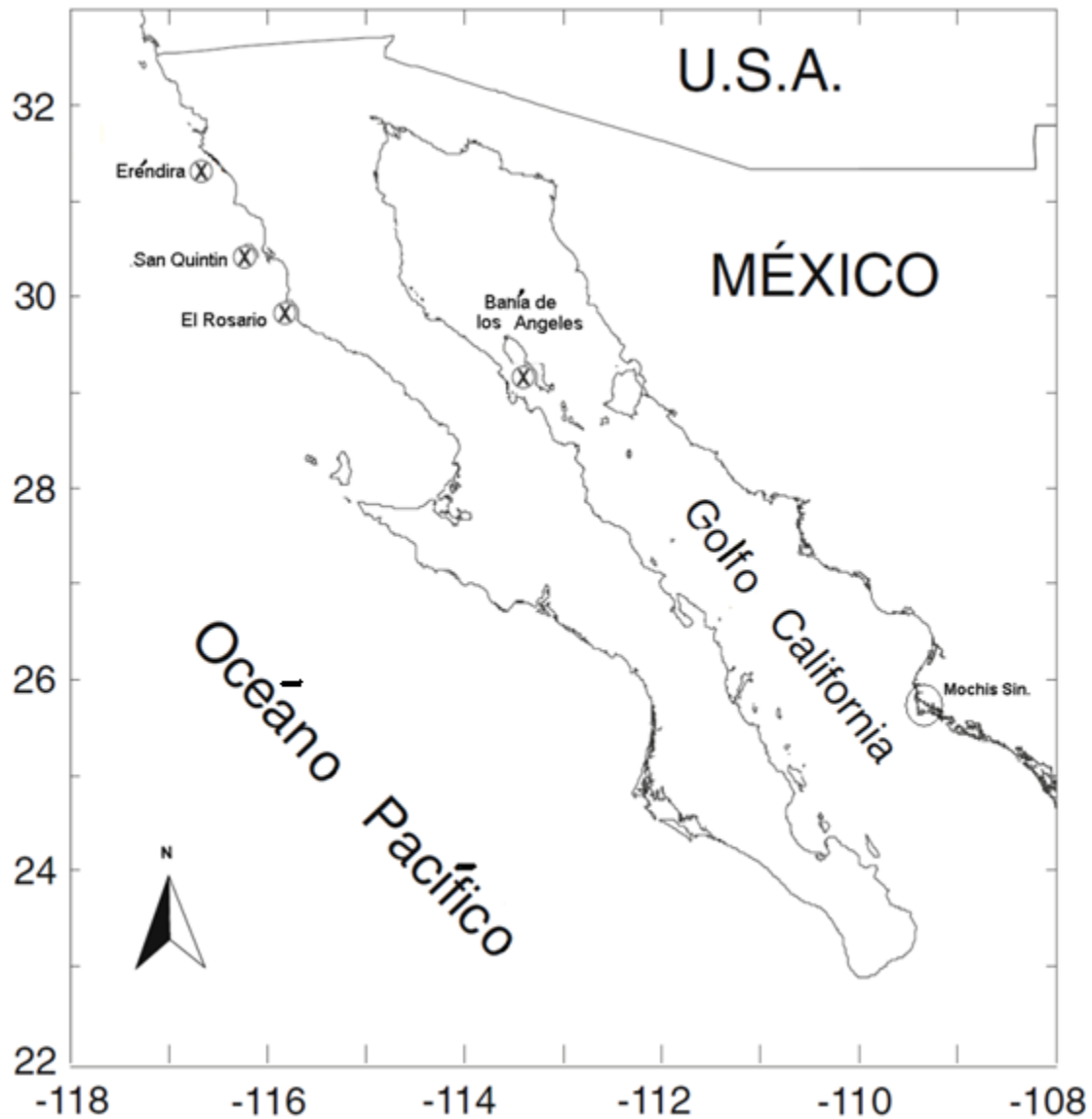


Figura 2.1 Localidades de colecta de los ejemplares de este estudio. Las algas pardas: *Silvetia compressa*, *Hesperophycus californicus*, *Halidrys dioica*, *Egregia menziesii*, *Eisenia arbórea*, *Macrocystis pyrifera*, en el Pacífico, mientras que *Padina durvillaei* y *Sargassum johnstonii* en el Golfo de California. Las algas verdes *Ulva lactuca*, *U. nematoidea* y *Codium fragile* se colectaron en las localidades de San Quintín y El Rosario B.C., mientras que *U. clathrata* proviene de tanque de cultivo en el IIO-UABC.

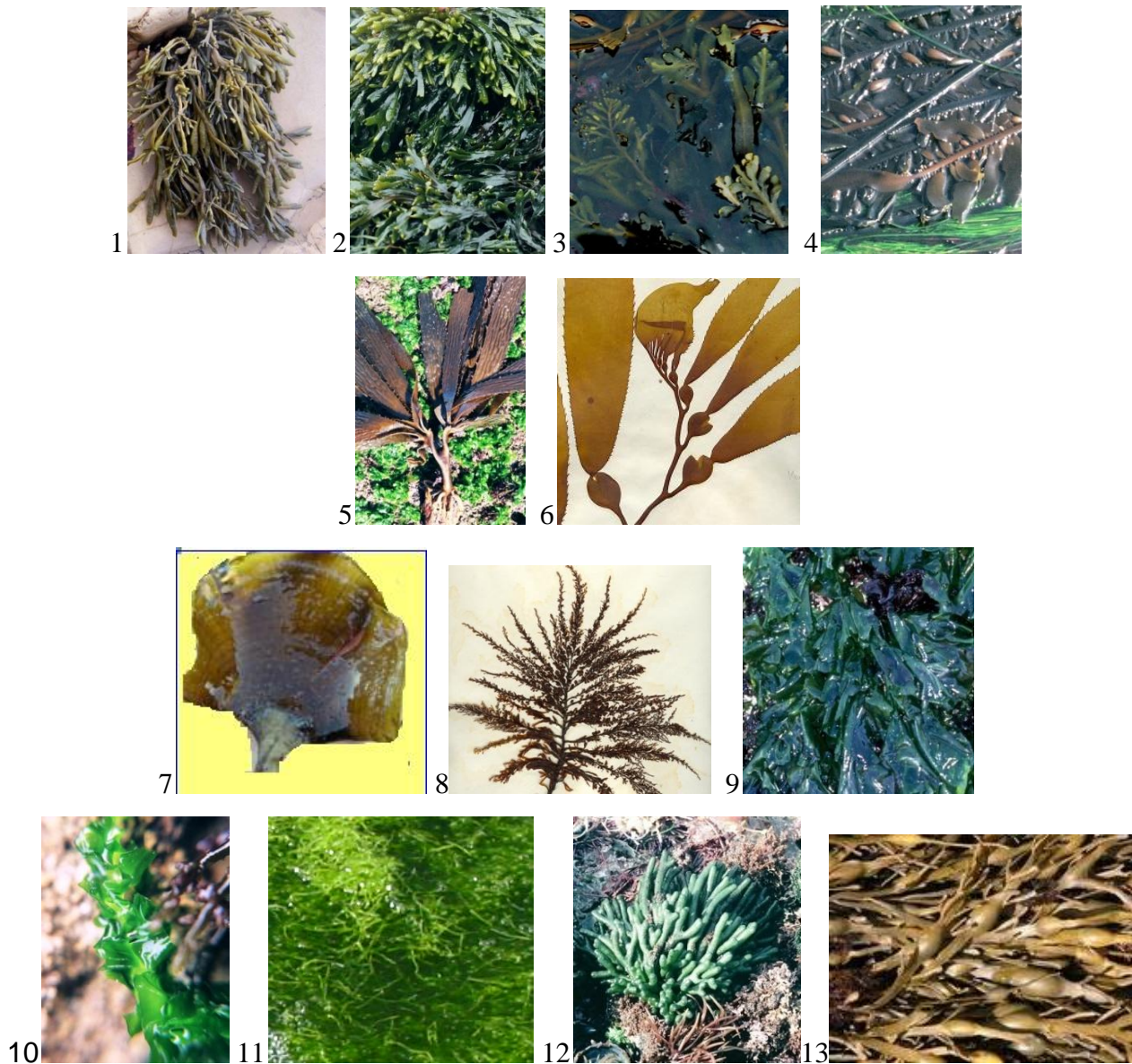


Figura 2.2 Algas del pacífico templado mexicano empleadas en este estudio. En el Pacífico, las algas pardas, *Silvetia compressa* (1), *Hesperophycus californicus* (2), *Halidrys dioica* (3), *Egregia menziesii* (4), *Eisenia arborea* (5), *Macrocystis pyrifera* (6); del golfo de California, las algas pardas *Padina durvillaei* (7) y *Sargassum johnstonii* (8). Además, las algas verdes del Pacífico, *Ulva lactuca* (9), *U. nematoidea* (10). *U. clathrata* (11) y *Codium fragile* (12), así como una muestra comercial de harina del alga parda, *Ascophyllum nodosum* (13).

Tabla II.1 Listado de especies del Pacífico templado mexicano, empleadas en este estudio; se incluye, división localidad y fecha de colecta.

	Género/especie	División	Posición en el perfil	Lugar de colecta	Fecha de colecta
1	<i>Silvetia compressa</i>	Phaeophyta	Intermareal superior	Eréndira, San Quintín y El Rosario.	Marzo 2007
2	<i>Hesperophycus californicus</i>	Phaeophyta	Intermareal superior	El Rosario	Marzo 2007
3	<i>Halidrys dioica</i>	Phaeophyta	Intermareal medio	El Rosario	Marzo 2007
4	<i>Egregia menziesii</i>	Phaeophyta	Submareal	El Rosario	Marzo 2007
5	<i>Eisenia arborea</i>	Phaeophyta	Submareal	El Rosario	Marzo 2007
6	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Phaeophyta	Submareal	El Rosario	Marzo 2007
7	<i>Padina durvillaei</i>	Phaeophyta	Intermareal medio	Bahía de los Ángeles	Abril 2007
8	<i>Sargassum johnstonii</i>	Phaeophyta	Submareal	Bahía de los Ángeles	Abril 2007
9	<i>Ulva lactuca</i>	Chlorophyta	Intermareal superior	San Quintín	Marzo 2007
10	<i>Ulva nematoidea</i>	Chlorophyta	Intermareal superior	Eréndira	Marzo 2007
11	<i>Ulva Clathrata</i>	Chlorophyta	Intermareal	Pozas de cultivo IIO y Mochis Sin.	Marzo 2007
12	<i>Codium fragile</i>	Chlorophyta	Intermareal medio	El Rosario	Marzo 2007
13	<i>Ascophyllum nodosum</i>	Phaeophyta	Intermareal superior	Muestra Comercial (Irlanda)	2009

Tabla II.2 Autoridad de las especies empleadas.

N.	Género/especie	Autoridad
1	<i>Silvetia compressa</i>	(J. Agardh) Serrao, Cho, Boo, et Brawley
2	<i>Hesperophycus californicus</i>	P.C. Silva
3	<i>Macrocystis pyrifera</i>	(Linnaeus) C.A. Agardh
4	<i>Eisenia arborea</i>	Areschoug
5	<i>Egregia menziesii</i>	(Turner) Areschoug
6	<i>Halidrys dioica</i>	N.L. Gardner
7	<i>Sargassum johnstonii</i>	Setchell and Gardner
8	<i>Padina durvillaei</i>	Bory
9	<i>Ulva lactuca</i>	Linnaeus
10	<i>U. clathrata</i>	(Roth) C. Agardh
11	<i>U. nematoidea</i>	Bory de Saint-Vincent
12	<i>Codium fragile</i>	(Suringar) Hariot
13	<i>Ascophyllum nodosum</i>	(Linnaeus) Le Jolis

Cada muestra, dependiendo del tamaño de los organismos, consistió de un mínimo de 10 ejemplares. Una vez colectados se transportaron frescas al laboratorio en Ensenada, donde se deshidrataron en un secador de placas, con corriente de aire a temperatura controlada de 40°C; posteriormente se molieron hasta un tamaño de partícula ≤ 1 mm de diámetro. Se conservaron en recipientes herméticos para su análisis.

II.4.2 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE POLISACÁRIDOS SULFATADOS SOLUBLES

Basados en los resultados obtenidos en la selección del método de extracción del capítulo anterior, la extracción de polisacáridos solubles se realizó, mediante una modificación del método para fucoídán, propuesto por Larsen (1978). Brevemente, el método consistió, en colocar 3 g de alga seca y molida en 60 mL de HCl 0.1 N a baño maría a 60°C durante 2 horas; se centrifugó y el residuo se re-extrajo con 30 mL de HCl 0.1 N por 60 minutos adicionales. Se centrifugó y los extractos se combinaron; se filtró a vacío con tierra de diatomeas, se concentró y precipitó con 3 volúmenes de etanol. Las extracciones se realizaron por triplicado. Los grupos hemiéster sulfato se cuantificaron por el método turbidimétrico de BaCl₂-Gelatina, usando K₂SO₄ como estándar (Tabatabai, 1974, modificado por Craigie y Wen, 1984).

II.4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

En todos los métodos espectrofotométricos empleados, se realizó una modificación de la técnica. La modificación consistió en reducir proporcionalmente todos los reactivos a un volumen final de 1 mL.

Carbohidratos totales (Chos): en el extracto seco, se determinaron colorimétricamente por el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Donde galactosa, fucosa y ramnosa respectivamente, se usaron como estándar.

Fucosa para algas pardas y ramnosa para los extractos de algas verdes; se cuantificaron colorimétricamente por el método de cisteína (Dische, 1955); donde, como estándar, se emplearon fucosa y ramnosa respectivamente.

Ácidos urónicos: se cuantificaron por el método modificado de Carbazol (Bitter y Muir, 1962), donde se usó ácido glucurónico como estándar.

Espectros de infrarrojo: se adquirieron mediante un espectrofotómetro Beckman modelo FTIR-100. Para analizar la muestra, aproximadamente 3 mg del extracto seco, obtenido de cada una de las especies, se homogeneizaron con KBr sólido y bajo presión, se formó una pastilla; esta pastilla, se colocó en el soporte del espectrofotómetro, para obtener el espectro correspondiente. Se corrió contra el aire, y el espectro se adquirió en modo de transmisión en el rango de 400 to 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , para cada muestra, se hicieron 10 barridos aplicando las transformadas de Fourier.

II.4.4 CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE FUCOIDÁN

Para evaluar el contenido de fucoidán, directamente de las algas secas, se empleó el método espectrofotométrico propuesto por Larsen (1978). Se pesaron por duplicado, muestras de 20 a 50 mg de alga seca y molida ($\phi \leq 1$ mm), se colocaron en tubos eppendorf con 1 mL de HCl 0.2 N y se calentaron en baño maría por 1 h a 60°C; se centrifugó para separar el extracto líquido, mientras que el sólido remanente, se sometió a una segunda extracción en las mismas condiciones; se centrifugó y los dos extractos se mezclaron. Se mide el volumen del extracto total y se analizó el contenido de fucoidán, ácidos urónicos y carbohidratos totales; una alícuota del extracto (0.5 mL) se hidrolizó en HCl 2 M por dos horas a 100°C para análisis de sulfatos.

Una muestra comercial de harina del alga parda *Ascophyllum nodosum* (Arramara Teoranta, Irlanda) con contenido conocido de fucoidán se sometió al mismo procedimiento de cuantificación.

II.4.5 RAZÓN MOLAR DE COMPONENTES

Una vez que se evaluó el contenido de cada uno de los componentes del fucoidán obtenido de los productos que resultaron de las diferentes técnicas, como una medida de comparación entre especies, se determinó la razón molar de sus componentes en relación a la fucosa para algas pardas (fucosa : sulfatos : ácidos urónicos) y para algas verdes la ramnosa (ramnosa : sulfatos : ácidos urónicos).

II.5 RESULTADOS

Los resultados muestran que, de todas las especies de macroalgas empleadas en el estudio, es posible extraer en medio ácido una fracción de los polisacáridos presentes, los cuales poseen como grupo iónico principal al grupo aniónico, hemiester sulfato.

II.5.1 RENDIMIENTO

En general para todas las macroalgas empleadas en este estudio, los mayores rendimientos de polisacáridos solubles, se obtuvieron para las algas verdes, donde, el rendimiento para las especies de *Ulva* estuvieron en el rango de 15 a 30%; sin embargo, la excepción, se presentó en el alga verde *Codium fragile*, donde, el rendimiento obtenido, estuvo por debajo de este rango (10%) (Fig. 2.3).

En relación a las algas pardas, el rendimiento, fluctuó de 6 a 14%, donde, el contenido mayor de polisacáridos solubles, fue para la especie intermareal de la familia fucaceae *Silvetia compressa*, que presentó un contenido de 14.18%; en contraste, el contenido mínimo se obtuvo para una especie del submareal *Macrocystis pyrifera* con 7.1 % (Fig. 2.3).

II.5.2 CONTENIDO DE SULFATOS

De manera similar, el mayor contenido de grupos hemiester sulfato se presentó en las algas verdes, en particular en las especies de *Ulva*; donde para *Ulva lactuca* se determinó un contenido de 31% (Tabla II.1).

El rango de sulfatos encontrado para todas las especies estuvo entre 4.8 a 31%, donde el mayor contenido de grupos hemiester sulfato en general lo presentaron las algas verdes en particular las especies de *Ulva* con 31% para *U. lactuca*. En el caso de las algas pardas, *Padina durvillaei*, especie intermareal, mostró un grado de sulfatación cercano al máximo obtenido para el alga verde *Ulva* con un contenido de grupos hemiester sulfato de 28.7%; por otra parte, el mínimo de sulfatos, se presentó en el alga parda del submareal *Egregia sp.*

Tabla II.3 Rendimiento de carbohidratos solubles y contenido de grupos hemiester sulfato (OSO_3^-) en especies de macroalgas de la región. Método gravimétrico. En % del peso seco del alga n=3

Especie	Rendimiento %	D. Est.	Sulfatos %	D.Est.
<i>Egregia</i>	7.42	0.56	4.8	0.13
<i>Eisenia</i>	13.07	0.75	6.6	0.40
<i>Halidrys</i>	9.55	1.20	5.69	0.13
<i>Hesperophycus</i>	6.24	0.35	12.08	0.40
<i>Macrocystis</i>	9.16	0.84	13	0.29
<i>Padina</i>	11.58	1.64	28.7	0.12
<i>Sargassum</i>	13.07	1.30	14.94	0.49
<i>Silvetia</i>	14.18	0.85	12.81	0.27
<i>Ulva clathrata</i>	15.75	1.15	23.7	0.26
<i>Ulva nematoidea</i>	25.43	1.81	17.3	0.20
<i>Ulva lactuca</i>	30.00	1.23	31	1.75
<i>Codium</i>	10.06	0.34	6.95	0.23

II.5.3 POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE ALGAS PARDAS (FUCOIDÁN)

Los resultados obtenidos mediante la cuantificación espectrofotométrica directa de fucoidán en las algas pardas, expresados en relación al peso original de la muestra empleada, en la mayoría de los casos, son consistentes con el rendimiento de polisacáridos sulfatados obtenidos gravimétricamente. Los resultados, como puede observarse en la Tabla II.I, muestran que el polisacárido soluble obtenido de las especies regionales de algas pardas contiene fucoidán, como polisacárido principal (fucosa), con un grado variable de sulfatación y contenido de ácidos urónicos. Mediante este método, la especie intermareal de la familia Fucaceae *Silvetia* presentó el mayor contenido de fucoidán, seguido de especies como *Eisenia* y *Sargassum* ambas con un rendimiento de 13.07%. Por otra parte, el contenido menor de fucoidán correspondió a especies submareales como *Egregia* sp y *Macrocystis pyrifera*. En todos los casos el contenido de ácidos urónicos (0.72 a 4.79%) fue menor al contenido de sulfatos excepto para *Egregia* sp. y *Halidrys* (Figura 2.4).

II.5.4 POLISACÁRIDOS SULFATADOS DE ALGAS VERDES (ULVÁN)

Similar a lo encontrado para algas pardas, todas las algas verdes analizadas contienen ramnosa, grupos hemiester sulfato y ácidos urónicos (Fig. 2.5). En las especies de *Ulva*, el residuo ramnosa es el componente principal del polisacárido extraído, mientras que en *Codium*, la ramnosa representó, menos del 10% del polisacárido total extraído. El contenido de sulfatos y ácidos urónicos siguió un patrón similar al contenido de ramnosa, donde las especies de *Ulva* estuvieron más sulfatadas (3.45 a 16.5%) y con mayor contenido de ácidos urónicos que el extracto de *Codium*.

Ulva clathrata mostró el mayor contenido de sulfatos y ácidos urónicos (16.5 y 3.93%, respectivamente) que las otras especies de *Ulva* analizadas.

II.5.5 INFRARROJO

Los espectros obtenidos para las diferentes especies de algas pardas y verdes analizadas, son congruentes con la composición química, ya que muestran las señales características para ácidos urónicos (1617 , 1414 cm^{-1}) y varias señales relacionadas a los grupos sulfato, como la señal a 1240 cm^{-1} atribuida a la vibración del enlace S=O y la señal a 840 cm^{-1} , que se relaciona a la vibración de un grupo sulfato en posición axial (4 sulfato). Esta misma señal presenta una pequeña protuberancia en $820\text{-}830\text{ cm}^{-1}$, la cual pudiera corresponder a un grupo sulfato en posición ecuatorial (2 sulfato), aunque esto no se presenta en los espectros de todas las especies.

En todos los espectros, puede notarse la presencia de una señal menor a 890 cm^{-1} , la cual pudiera estar relacionada a la vibración de las moléculas de fucosa o ramnosa desulfatada, (Fig. 2.6 y Fig. 2.7 respectivamente).

En el caso de las algas verdes, en particular en las especies de *Ulva*, el espectro de infrarrojo muestra las señales anteriores, más una señal adicional a 790 cm^{-1} (Fig.2.7b y d). En lo que respecta al espectro obtenido para *Codium fragile*, donde además de las señales para el enlace C= O de los ácidos urónicos (1642 cm^{-1} y 1420 cm^{-1}) y los enlaces sulfato S= O (1260 cm^{-1}), se presentan señales distintivas para esta especie a 870 , 810 y 759 cm^{-1} (Figura 2. 7a).

II.5.6 RAZÓN MOLAR DE COMPONENTES

La razón molar de componentes en los extractos, es una herramienta útil para evaluar la heterogeneidad de un compuesto, en este caso puede observarse que en la mayoría de las algas pardas analizadas, el grado de sulfatación corresponde a más de un grupo sulfato por unidad monomérica. En algunos casos los ácidos urónicos se encuentran en proporciones altas del compuesto extraído, en particular en el alga parda *Egregia* donde corresponde un valor de 3 moles de ácidos urónicos por unidad de fucosa (Tabla II.3).

En el caso de las algas verdes, particularmente en *Codium*, se presenta algo similar en la proporción de componentes, donde el contenido de sulfatos es alto en relación al contenido de ramnosa; esto en consecuencia, indica la presencia de otro tipo de azúcares sulfatados diferentes a la ramnosa (Tabla II.3, 4).

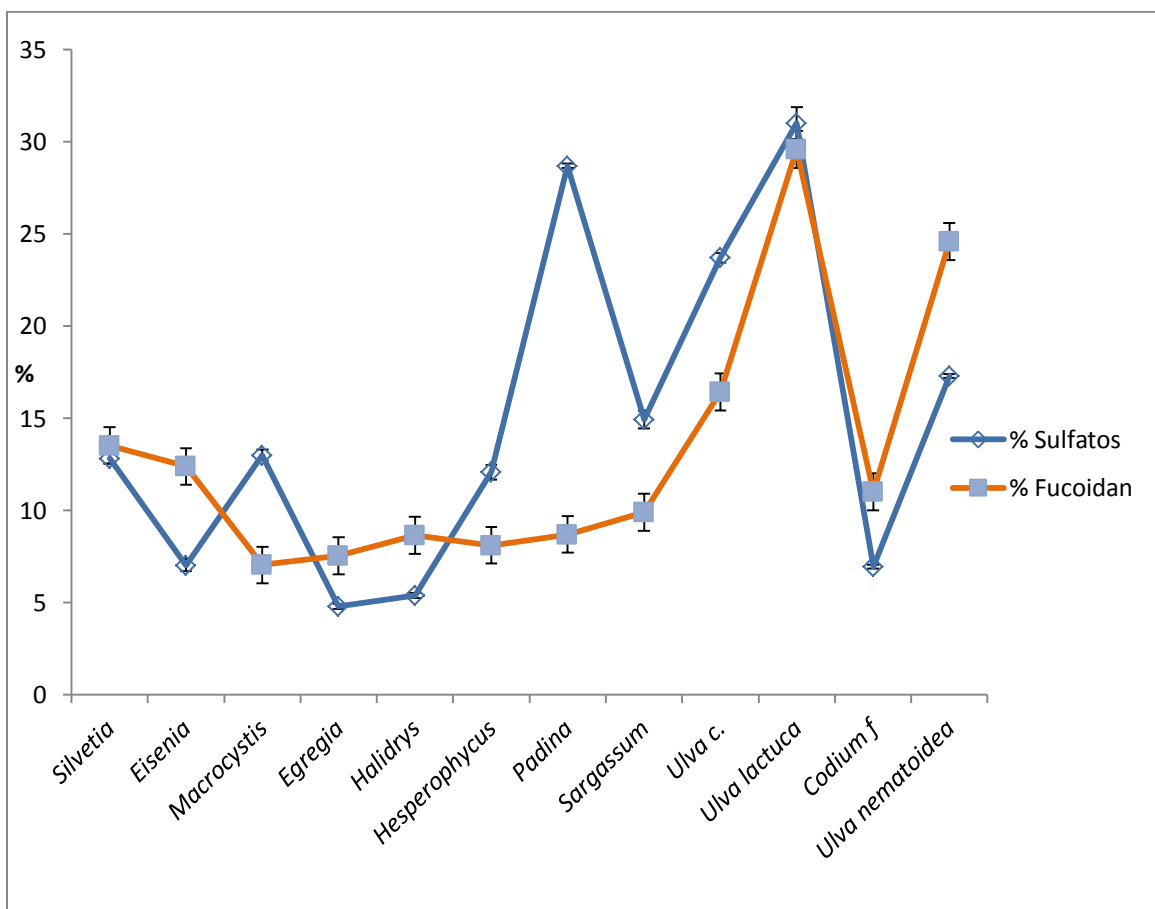


Figura. 2.3 Rendimiento de carbohidratos solubles en especies de macroalgas de la región. Método gravimétrico. Se muestra su contenido de grupos hemiéster sulfato (OSO_3^-), donde las barras verticales representan el error estándar $n=3$.

Tabla II.4 Composición de los polisacáridos solubles de especies de macroalgas pardas de las costas de Baja California. Evaluadas por el método indirecto (Larsen, 1978). Se realizaron 4 réplicas.

	CHOs	% Fucoidan	Sulfatos	Ac Uronicos
<i>Silvetia</i>	15.1	13.7	5.2	4.4
<i>Eisenia</i>	13.2	4.1	3.1	2.6
<i>Macrocystis</i>	2.9	1.8	1.9	1.9
<i>Egregia</i>	2.1	0.8	0.8	1.7
<i>Sargassum 1</i>	6.4	4.8	3.5	1.8
<i>Sargassum 2</i>	5.6	2.9	2.6	2.0
<i>Sargassum 3</i>	7.5	3.7	3.1	2.8
<i>Halidrys</i>	5.5	3.0	1.3	2.5
<i>Hesperophycus</i>	12.0	10.0	6.8	2.2
<i>Padina</i>	3.2	2.1	4.0	0.7
<i>Ascophyllum</i>	14.6	11.6	4.9	3.8
<i>Silvetia Autoclave</i>	17.4	11.0	4.2	4.8

1. Bahía Guadalupe, 2. B. Alacrán 3. B. Alcatraz

Tabla II.5 Composición de los polisacáridos solubles de algas verdes de las costas de Baja California. Evaluadas por el método indirecto (Larsen, 1978). Se realizaron 4 réplicas.

	CHOs	% Ramnanao	Sulfatos	Ac Uronicos
<i>Codium</i>	10.2	0.8	3.4	0.8
<i>Ulva clathrata</i>	10.3	10.8	16.5	3.9
<i>Ulva nematoidea</i>	10.4	9.9	6.6	2.9
<i>Ulva lactuca</i>	11.2	12.0	11.8	3.5

Tabla II.6 Contenido de polisacáridos solubles en algas de la región. Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Donde letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha= 0.050$, Error entre el cuadrado de las medias= 4.0413, g.l. = 18. La numeración en el encabezado representa a grupos homogéneos.

	ESPECIE	Promedio	1	2	3	Significancia
3	<i>Macrocystis</i>	7.0	****			c
4	<i>Egregia</i>	7.5	****			c
6	<i>Hesperophycus</i>	8.1	****			c
5	<i>Halidrys</i>	8.7	****			c
7	<i>Padina</i>	8.7	****			c
8	<i>Sargassum</i>	9.9	****			c
11	<i>Codium f</i>	11.0	****	****		bc
2	<i>Eisenia</i>	12.4	****	****		bc
1	<i>Silvetia</i>	13.5	****	****		bc
9	<i>Ulva clathrata</i>	16.4		****		b
12	<i>U. nematoidea</i>	24.6			****	a
10	<i>U. lactuca</i>	29.6			****	a

Tabla II.7 Contenido de sulfatos en los polisacáridos solubles de macroalgas de la región. Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Donde letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha= 0.05$, Error entre el cuadrado de las medias= 0.55, gl = 44

	ESPECIE	PROM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	SIG.
4	<i>Egregia</i>	4.8		****								l
5	<i>Halidrys</i>	5.4		****	****							hi
11	<i>Codium</i>	7.0			****	****						gh
2	<i>Eisenia</i>	7.0				****						g
6	<i>Hesperophycus</i>	12.1	****									f
1	<i>Silvetia</i>	12.8	****									f
3	<i>Macrocystis</i>	13.0	****									f
8	<i>Sargassum</i>	14.9					****					e
12	<i>Ulva</i>	17.3						****				d
	<i>nematoidea</i>											
9	<i>U. clathrata</i>	23.7							****			c
7	<i>Padina</i>	28.7								****		b
10	<i>U. lactuca</i>	31.0									****	a

Tabla II.8 Contenido de polisacáridos solubles en algas de la región (Método indirecto Larsen, 1978). Prueba a posteriori, para grupos homogéneos. Para n desiguales. Letras iguales, no hay diferencias significativas $\alpha = 0.05$, Error entre el cuadrado de las medias = 1.14, gl = 37.

	Especie	Promedio	1	2	3	4	Diferencias
4	<i>Egregia</i>	0.84	****				d
3	<i>Macrocystis</i>	1.76	****	****			cd
11	<i>Padina</i>	2.05	****	****			cd
6	<i>Sargassum 2</i>	2.11	****	****			cd
5	<i>Sargassum 1</i>	2.76	****	****			cd
9	<i>Halidrys</i>	3.03	****	****			cd
8	<i>Sargassum3</i>	3.31	****	****			cd
7	<i>Sargasum 3</i>	3.69	****	****			cd
2	<i>Eisenia</i>	4.15		****			c
10	<i>Hesperophycus</i>	9.98			****		b
13	<i>Silvetia</i> (autoclave)	11.03			****	****	ab
12	<i>Ascophyllum</i>	11.26			****	****	ab
1	<i>Silvetia</i>	13.68				****	a

Tabla II.9 Contenido de ramnosa en algas verdes. Prueba a posteriori de Tukey para grupos homogéneos $\alpha = 0.05$; Error: Entre el cuadrado del promedio = 0.57, gl = 12 Letras iguales no hay diferencias significativas.

Var1	Var2 Promedio	1	2	3	Significancia
Especie	101.00				
<i>Codium fragile</i>	0.75			****	c
<i>Ulva nematoidea</i>	9.93	****			b
<i>Ulva clathrata</i>	10.77	****	****		ab
<i>Ulva lactuca</i>	12.03		****		a

Tabla II.10 Razón molar de componentes **Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos**, calculada para los extractos ácidos obtenidos de las diferentes especies de algas pardas.

ESPECIE	FUCOSA	SULFATOS	ÁCIDOS URÓNICOS
<i>Silvetia compressa</i>	1.0	1.0	0.5
<i>Eisenia arborea</i>	1.0	2.0	0.9
<i>Eisenia arborea</i> Juvenil	1.0	4.9	1.9
<i>Macrocystis pyrifera</i>	1.0	2.8	1.6
<i>Egregia menziesii</i>	1.0	2.6	3.0
<i>Sargassum johnstonii</i> (Bahía Guadalupe)	1.0	2.0	0.6
<i>Sargassum johnstonii</i> (Bahía Alacrán)	1.0	2.4	1.0
<i>Sargassum johnstonii</i> (Bahía Alcatraz)	1.0	2.3	1.1
<i>Halidrys dioica</i>	1.0	1.1	1.2
<i>Hesperophycus californicus</i>	1.0	1.8	0.3
<i>Padina durvillaei</i>	1.0	5.2	0.5
<i>Ascopyllum nodosum</i>	1.0	1.1	0.5

Tabla II.11 Razón molar de componentes Ramnosa: Sulfatos: Ac. Urónicos, calculada para los extractos ácidos obtenidos de las diferentes especies de algas verdes.

ESPECIE	RAMNOSA	SULFATOS	ÁCIDOS URÓNICOS
<i>Codium fragile</i>	1.0	12.3	1.6
<i>Ulva clathrata</i>	1.0	4.1	0.5
<i>Ulva nematoidea</i>	1.0	1.8	0.4
<i>Ulva lactuca</i>	1.0	2.6	0.4

ESPECTROS DE INFRARROJO.

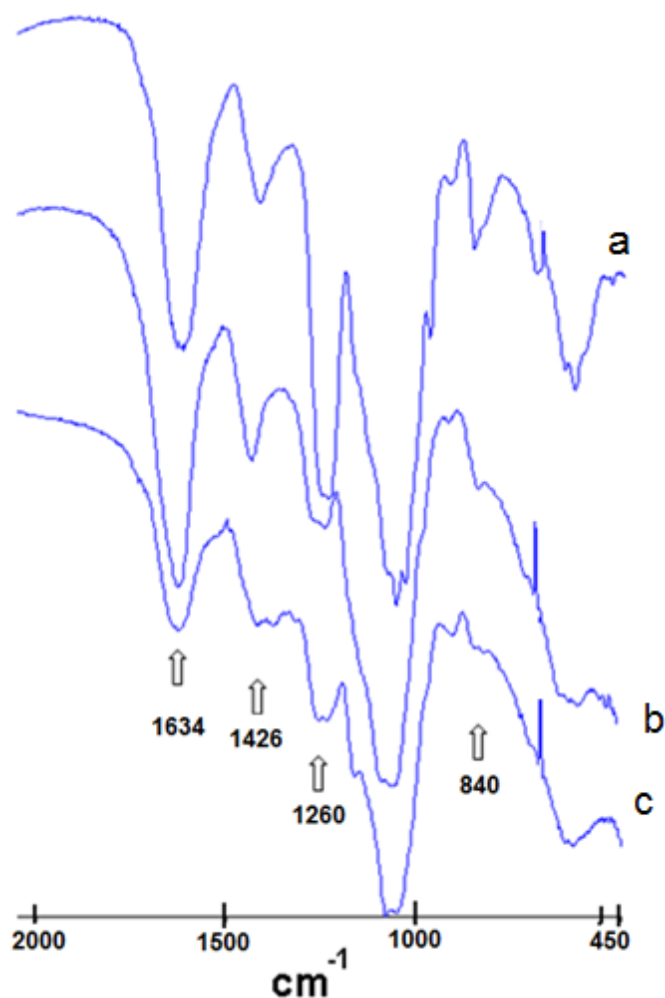


Figura 2.4 Espectros de infrarrojo de polisacáridos solubles obtenidos en medio ácido de algas pardas; a) *Macrocystis pyrifera*, b) *Halidrys dioica* y c) *Eisenia arborea*.

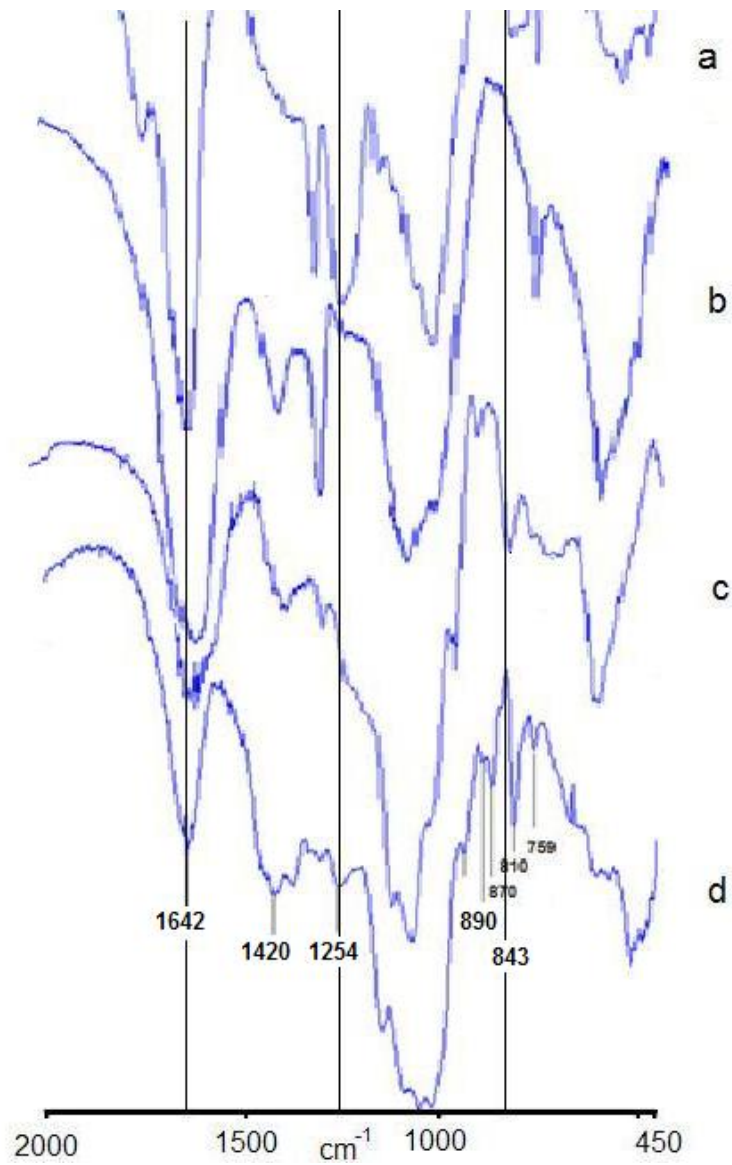


Figura 2.5 Espectros de infrarrojo de polisacáridos solubles en medio ácido obtenido de especies de algas verdes. a) *Ulva clathrata*- EDTA b) *U. clathrata*, c) *U. lactuca* y d) *Codium fragile*

II.6 DISCUSIÓN

En este estudio se determinó el contenido y composición de los polisacáridos solubles en medio acuoso de diferentes algas pardas y verdes de la región. Los resultados muestran que la extracción ácida, produce polisacáridos iónicos, los cuales poseen diferente contenido de grupos hemiéster sulfato y ácidos urónicos. En el polisacárido presente en las algas pardas, la fucosa es el azúcar predominante; de ahí que deba considerarse a estos polisacáridos, miembros de la familia del fucoidán (Percival, 1967; Kloareg y Quatrano, 1981; Painter, 1983).

En relación a las algas verdes, en el polisacárido obtenido, se detecta también la presencia de grupos hemiéster sulfato y ácidos urónicos; sin embargo, si bien en todas las algas verdes analizadas, se detecta la presencia del azúcar ramnosa, solo en las especies de *Ulva*, la ramnosa, es el componente principal. Lo anterior, concuerda con el hecho que en las ulvales se reporta la presencia de xiloramnanos sulfatados (Percival, 1967; Ray y Lahaye, 1995). Sin embargo, en el alga verde *Codium*, el comportamiento es diferente; en esta especie, el polisacárido soluble obtenido, el azúcar ramnosa, es solo un componente menor ($\leq 10\%$) del total del polisacárido extraído; este resultado, es congruente con el hecho de que en las especies de *Codium*, los polisacáridos presentes, son del tipo de los galactanos sulfatados (Kloareg y Quatrano, 1988, Lobban y Harrison, 1994, Farías *et al.*, 2008). En este mismo sentido Ciancia *et al.*, (2007) encuentran en *Codium vermilara* que el polisacárido sulfatado presente corresponde a un arabino-galactano sulfatado.

Entonces de acuerdo a lo expresado, en algas pardas y verdes (Ulvales) el polisacárido soluble en medio ácido, son polisacáridos sulfatados del tipo “no galactano” (PSNG); fucanos para algas pardas (fucoidán) y ramnanos o ulván para ulvales (Lahaye, 2001).

Es importante mencionar que en todos los casos, se detectó también, la presencia de cantidades variables de ácidos urónicos. Los ácidos urónicos detectados en los extractos, pueden ser, parte componente del sistema de polisacáridos sulfatados tipo fucoidán, tal como lo refieren diferentes investigadores, quienes mencionan al ácido

glucurónico como componente del fucoidán de diferentes materias primas (Mian y Percival, 1973; Nishino *et al.*, 1991; Tako *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Sin embargo, en particular para algas pardas, la presencia de este componente, pudiera, también, deberse en parte a la extracción concomitante de alginatos, presentes en la matriz celular algal; dado que el proceso de obtención se realizó en medio ácido, condición en que los alginatos se deben mantener insolubles, entonces la interferencia por éstos debiera ser mínima. Sin embargo, a pesar de lo anterior, aún cabría la posibilidad, de que algo de los ácidos urónicos detectados, sean parte del sistema de alginatos presente en las algas pardas; debido principalmente al hecho de que algunos tipos de alginatos, pueden mostrar cierta solubilidad en medios ácidos, tales como alginatos de bajo peso molecular; además, los alginatos enriquecidos en fracción alternante de ácido manurónico y ácido gulurónico (MG), también muestran cierta solubilidad en medios ácidos (Haug, 1964; Smidsrod, 1973; Rinaudo, 2007).

Para las algas verdes la presencia de los ácidos urónicos, está plenamente demostrado que éstos son parte componente del sistema de polisacáridos sulfatados; en particular del ulván, el cual, se considera que está formado principalmente por ácidos ulvanobiurónicos y en menor grado por ulvanobiosas (Percival y wold, 1963; Percival y McDowell, 1967; Lahaye y Ray, 1996; Lahaye *et al.*, 1997; Lahaye, 2001; Mao *et al.*, 2004).

El análisis de infrarrojo es una herramienta útil para el análisis de este tipo de compuestos ya que nos permite determinar la composición de los polisacáridos en función de sus grupos funcionales sustituyentes, tales como los ácidos urónicos y particularmente los grupos hemiéster sulfato, los cuales pueden ocupar diferente posición dentro de la cadena del polisacárido.

En el caso particular de los extractos de las algas pardas, los espectros de infrarrojo, muestran señales características reportadas para el fucoidán de *Fucus vesiculosus* (Patankar *et al.*, 1993). Se presentan señales en 1250, 1617, 1414, 840 cm^{-1} ; además de una señal pequeña a 890 cm^{-1} . Donde las señales a 1250 cm^{-1} y 840 cm^{-1} son indicativas de la presencia de sustituciones por ésteres de sulfato (Lloyd *et al.* 1961;

Rochas, 1986; Tako *et al.*, 1999). Las señales a 1617, 1414 cm^{-1} son atribuidos a la vibración asimétrica y simétrica respectivamente del enlace C=O en los carboxilos (Rao 1967; Bociek y Welti 1975; Casu *et al.*, 1978).

Por otra parte los espectros obtenidos para los extractos de *U. clathrata* muestran señales similares a las encontradas para algas pardas, las cuales, indican la presencia de grupos sulfato (1240-1250 cm^{-1}) y ácidos urónicos (1637-1417 cm^{-1}); se presenta una señal clara a 840 cm^{-1} , relacionada a la presencia de un grupo sulfato en posición axial; una señal a 790 cm^{-1} , característica para los ulvanes, probablemente debida a la presencia de azúcares cíclicos (Castro *et al.*, 2006; Robic, 2008; Robic *et al.*, 2009). Similar a las señales para las algas pardas, en el espectro de esta especie, también se observa una pequeña señal a 890 cm^{-1} , esta, pudiera estar relacionada a la configuración β del enlace glicosídico (Barker *et al.*, 1954). El caso de *Codium fragile*, además de las señales correspondientes a los ácidos urónicos y grupos sulfato se presenta una señal a 870 y otra a 810 cm^{-1} , estas señales son reportadas para una fracción de manopiranosil con un bajo contenido de sulfatos de *Codium fragile* (Estevez *et al.*, 2009).

Con lo anterior expresado, no se pretende decir que la composición de los polisacáridos solubles de las algas verdes (Ulvales) es similar en el sentido estricto a la composición del extracto obtenido de las algas pardas; sin embargo, es importante reconocer que la similitud mostrada se debe a la presencia de grupos funcionales equivalentes como ramnosa (deoxi-azúcar, similar a la fucosa), grupos hemiester sulfato y ácidos urónicos tal como lo menciona McCandless, (1981) (Percival, 1964,1978, Castro *et al.*, 2006; Mao *et al.*, 2006; Lahaye y Robic, 2007). Aunque no hay ninguna correlación filogenética entre algas pardas y verdes, ambos grupos contienen polisacáridos sulfatados del tipo no galactanos (PSNG).

CAPÍTULO III

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS POLISACÁRIDOS SULFATADOS (FUCOIDÁN) DEL ALGA PARDA *Silvetia compressa* Y SUS VARIACIONES.

III.1 Introducción.....	60
III.2 Hipòtesis.....	63
III.3 Objetivos.....	64
III.3.1 Objetivo general.....	64
III.3.2 Objetivos particulares.....	64
III.4 Materiales y métodos.....	65
III.4.1 Materias primas.....	65
III.4.1.1 Variaciones geográficas.....	66
III.4.1.2 Separaciòn de tejidos.....	66
III.4.1.3 Cultivo de <i>s. compressa</i> a diferentes temperaturas....	67
III.4.2 Extracciòn de fucoidán.....	68
III.4.3 Fraccionaciòn química de los ps.....	69
III.4.3.1 Fraccionaciòn con sales de magnesio-etanol.....	69
III.4.3.2 Fraccionaciòn con etanol sin sales de magnesio.....	70
III.4.5 Razòn molar de componentes.....	71
III.4.6 Espectros de infrarrojo.....	71
III.4.7 Fraccionaciòn por cromatografía de intercambio aniònico..	71
III.5 Resultados.....	73
III.5.1 Fraccionaciòn con etanol con y sin MgCl ₂	76

III.5.3 Cromatografía de intercambio aniónico.....	80
III.6 Discusiones.....	82

III.1 INTRODUCCIÓN

Los organismos marinos, son una fuente importante de polisacáridos aniónicos; particularmente, destaca la presencia de polisacáridos sulfatados. Entre los principales grupos de polisacáridos sulfatados, destacan los galactanos sulfatados; los cuales, se encuentran ampliamente distribuidos en algas rojas, verdes, angiospermas marinas, tunicados y erizo de mar (Aquino et al., 2005; Pomin y Mourao, 2008).

Sin embargo en el medio marino, hay otros grupos de polisacáridos sulfatados importantes; uno de ellos es el que se encuentra en las algas pardas y en equinodermos, éstos son los fucanos sulfatados, y un tercer grupo, es el que ocurre en algas verdes de la familia Ulvaceae, que poseen polisacáridos formados por la ramnosa sulfatada, (Percival, 1979; Painter, 1983; Kloareg y Quatrano, 1988).

Los carbohidratos son de los componentes principales de las macroalgas, en ellas, cumplen funciones de reserva energética y estructural y pueden representar más del 50% del peso seco de la planta (Darcy-Vrillon, 1993; Mabeau and Fleurence, 1993). De esta manera, las macroalgas se consideran como una fuente importante de fibra dietaria, ya que de los polisacáridos presentes en la pared celular más del 50% son solubles en agua (Lahaye, 1991).

Cada división algal tiene un sistema de polisacáridos característicos; en el caso particular de las algas pardas, dentro de los polisacáridos estructurales solubles en agua, se encuentran dos grupos principales; los alginatos y los fucanos sulfatados o fucoidanos. El primero de ellos es el grupo principal en las algas pardas y se compone de ácidos urónicos mientras que el segundo grupo constituye un porcentaje menor del peso seco del alga, pero es de una composición más compleja, donde el azúcar principal es la L-fucosa el cual, contiene una cantidad variable de grupos hemiester sulfato, ácido glucurónico y cantidades traza de azúcares neutros como galactosa y xilosa (Painter, 1983; Patankar, *et al.*, 1993; Bilan *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008). Mientras que los alginatos tienen un mercado bien definido dentro de la industria de los

ficocoloides, los polisacáridos sulfatados que contienen fucosa, se considera tienen un alto potencial como compuestos bioactivos (anticoagulante, antiviral, anticancerígeno entre otros) (McLellan y Jurd, 1992; Chevolot, 1999; Chizov 1999; Shanmugam y Mody 2000; Li *et al.*, 2008).

El término fucano se aplica en general, para polisacáridos de algas pardas y de equinodermos, formados por la fucosa, pero el término fucoidán, se aplica en particular para el fucano presente en las algas pardas; en ambos casos éstos polisacáridos, se caracterizan por poseer un grado variable de sulfatación; hasta la fecha no han sido reportados en la naturaleza, la ocurrencia de fucanos sin grupos sulfato (Bertheau y Mulloy, 2003).

En relación a la estructura, los fucanos de las algas pardas, se caracterizan por presentar estructuras complejas, a diferencia de lo que ocurre en los invertebrados marinos, cuyas estructuras son más simples (Alves *et al.*, 1997; Pomin y Mourao 2008).

En cuanto a la función que el fucoidán desempeña en las algas pardas; se le atribuye la función de proteger a la planta de la desecación y participar en actividades de osmoregulación (Percival, 1979; Kloareg y Quatrano, 1988); se encuentra en la pared celular, formando parte de un complejo proteoglicano, donde se entrelaza con los alginatos y la celulosa algal (McCandless, 1981); en particular este complejo, está formado por cantidades variables de fucosa, xilosa, galactosa, ácidos urónicos y grupos sulfato (Percival, 1968; Medcalf *et al.*, 1978; McCandless y Craigie, 1979; Painter, 1983; Kloareg *et al.*, 1986).

Debido a su complejidad y a las variaciones que ocurren entre diferentes fuentes, este proteoglicano debe ser considerado como una familia de polisacáridos dispersos de las algas pardas que contienen fucosa, por lo tanto, abarcan un amplio espectro de moléculas; desde aquellas que son ricas en ácidos urónicos y bajas en fucosa sulfatada, hasta aquellas con fucán sulfatado relativamente puro con un bajo contenido de ácidos urónicos (Larsen *et al.*, 1966, 1967; Mian y Percival, 1973; Hogsett y

Quatrano, 1975). Este polisacárido complejo puede fraccionarse, por diferentes medios, en estructuras de composición diferente (Schweiger, 1962; Larsen *et al.*, 1966, Bidwell *et al.*, 1972).

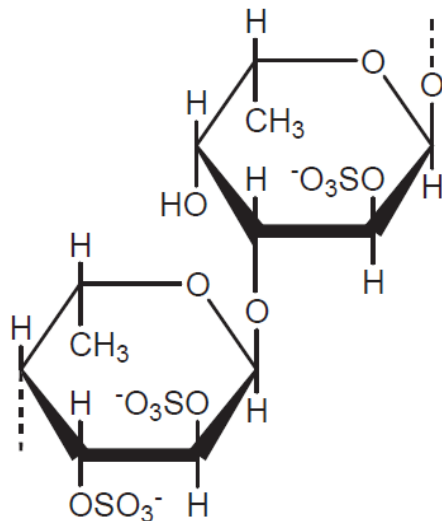


Figura 3.1 Estructura repetitiva encontrada en el Fucoidan de *Fucus vesiculosus* y *Ascophyllum nodosum* (L-fucopiranosil 2,3 disulfato α (1-3) α -L-fucopiranososa 2 sulfato)_n (Berteau y Mulloy, 2003).

Aunque probablemente todas las algas cafés contienen algo de fucoidán, el contenido y composición en las diferentes especies es variable (Chang-Hu, *et al.*, 2001, Ushakova *et al.*, 2009), tal como quedó demostrado en el capítulo anterior. En concordancia con la función que este polisacárido se supone desempeña en las macroalgas que es de proteger contra la desecación (Percival, 1979); entonces, es de esperar que mayores proporciones se presenten en especies de macroalgas que habitan en la parte superior de la zona intermareal y que pasan el mayor tiempo fuera del agua (Black, 1954). De esta manera, las especies más prominentes que contienen fucoidán pertenecen al grupo de las fucales (Painter, 1983), especies que distintivamente habitan en la posición superior del intermareal tal como ocurre en el Pacífico de Baja California con *Silvetia compressa* y *Hesperophycus californicus* (Mondragón y Mondragón, 2003).

Como se mencionó antes, la composición del fucoidán puede variar entre especies. Sin embargo, sus características se conservan entre división (Pomin y Mourao, 2008); en este sentido es posible entonces, que la composición del fucoidán, en las diferentes especies, siga un patrón de síntesis particular, el cual es afectado por factores de tipo biológico (estadio reproductivo, tipo de tejido etc.) (Mian y Percival 1973; Hogsett y Quatrano 1975), ambientales (foto periodo, periodo de exposición, temperatura etc.) (Black *et al.*, 1952) o bien por efecto del método de extracción empleado (Mabeau *et al.*, 1990, Silva *et al.*, 2005).

Es conocida la heterogeneidad del fucoidán y es probable que la bioactividad que se le atribuye a éste tipo de polisacáridos, esté relacionada a su composición química. Algunos estudios han demostrado que esta bioactividad esta en función del grado y posición de los grupos hemiester sulfato en la molécula, así como la configuración general de la molécula del fucoidán (Berteau y Mulloy, 2003; Ghosh, *et al.*, 2009; Ushakova *et al.*, 2009).

Con el propósito de determinar la heterogeneidad química del fucoidán del alga parda *Silvetia compressa* y conocer los factores que influyen en su composición, se caracterizó químicamente el extracto ácido nativo, obtenido del alga parda *S. compressa*, así mismo, se evaluaron los extractos de organismos sometidos a diferentes procesos químicos y condiciones ambientales.

III.2 HIPÓTESIS

III.2.1 En las algas pardas, los polisacáridos sulfatados, desempeñan una función estructural se encuentran en la matriz celular actúan como sustancias que protegen contra la desecación de las algas marinas, donde; por lo que el contenido y composición de estos compuestos, varían en función de factores biológicos (tipo de tejido) y físicos como la temperatura en que crece la planta.

III.2.2 Acorde a la función que desempeñan los polisacáridos sulfatados en las algas marinas, están formadas por una mezcla heterogénea de moléculas, las cuales en relación a sus características, pueden ser separadas en moléculas de composición diferente.

III.3 OBJETIVOS

III.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las características fisicoquímicas de los polisacáridos sulfatados del alga parda *Silvetia compressa*.

III.3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

III.3.2.1 Evaluar la composición y características de los PSNG de *Silvetia compressa* en función de a) la localidad geográfica b) temperatura en que crece y c) tipo de tejido.

III.3.2.2 Empleando diferentes técnicas de fraccionación, evaluar la heterogeneidad de los PSNG de *Silvetia compressa*.

III.4 MATERIALES Y MÉTODOS

III.4.1 MATERIAS PRIMAS

Silvetia compressa se colectó en tres localidades de Baja California, sitios, donde esta especie forma una franja característica en el nivel superior del intermareal: Ejido Eréndira, La Chorera en San Quintín y Punta Baja en el Rosario (Fig. 3.2).

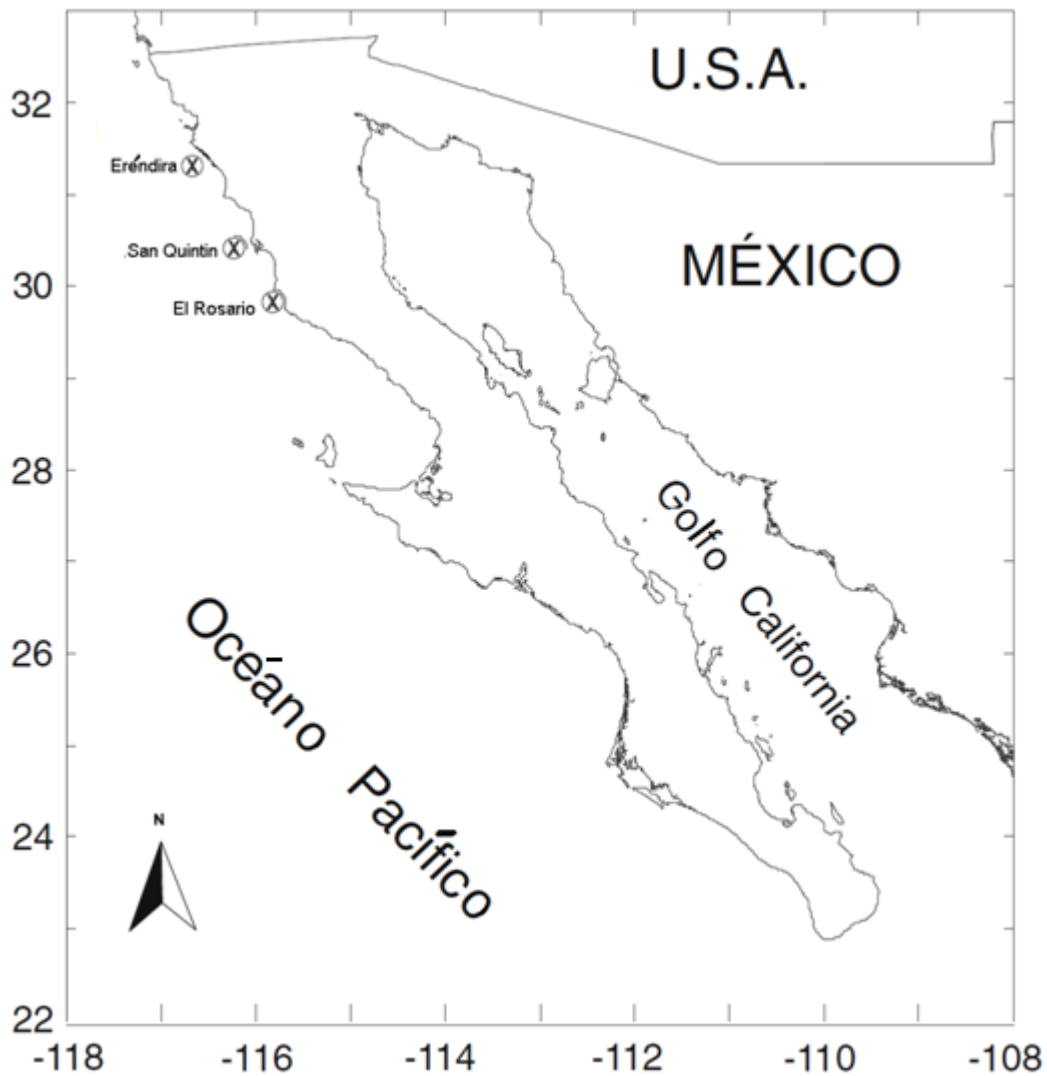


Figura III.2 Localidades de cosecha de *S. compressa*, en la costa del pacífico de Baja California.

III.4.1.1 VARIACIONES GEOGRÁFICAS

En cada localidad, de las arriba mencionadas, se colectaron aproximadamente 15 plantas completas. Cortando todos los estipes de la planta, justo arriba del órgano de fijación. Las plantas cosechadas se conservaron a temperatura ambiente en hieleras. Se transportaron a laboratorio, donde se deshidrataron en secador con corriente de aire a temperatura controlada de 40°C; se molieron en un molino de cuchillas con tamiz de 60 mesh.

III.4.1.2 SEPARACIÓN DE TEJIDOS

De las plantas secas de *Silvetia compressa*, se separaron los diferentes tejidos, tal como se muestra en la figura III.3:

Ápices: Porciones nuevas de la planta desprovistas de vesículas o fruto.

Fruto: Se consideró el fruto las vesículas presentes en las terminaciones de las dicotomías de la planta.

Basal: Esta fue la porción de la planta comprendida sobre el órgano de fijación, hasta las dicotomías secundarias.

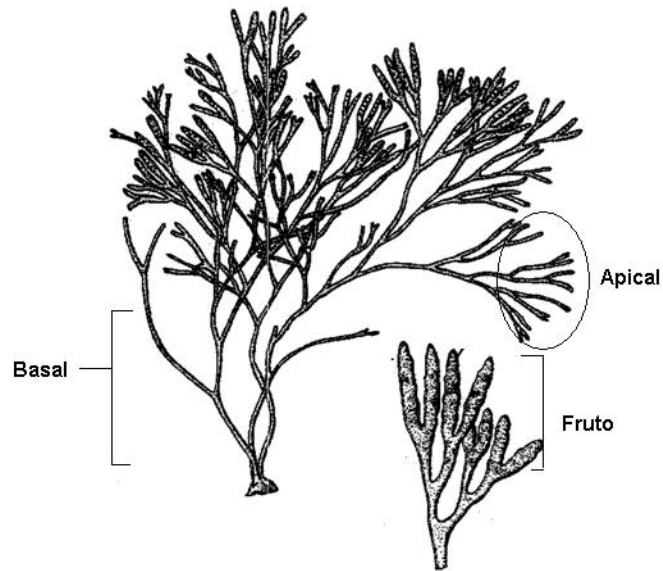


Figura III.3 Talo del alga parda *Silvetia compressa*, donde se muestra los diferentes tejidos.

III.4.1.3 CULTIVO DE *S. compressa* A DIFERENTES TEMPERATURAS

Para evaluar el efecto de la temperatura, se colectaron frondas completas provenientes de la Chorera en San Quintín B.C. En el laboratorio se separaron talos de las plantas que se colocaron en matraces de cultivo de 2 litros, los cuales se ponen dentro de cámaras de incubación con temperatura controlada a 10, 15 y 20°C respectivamente.

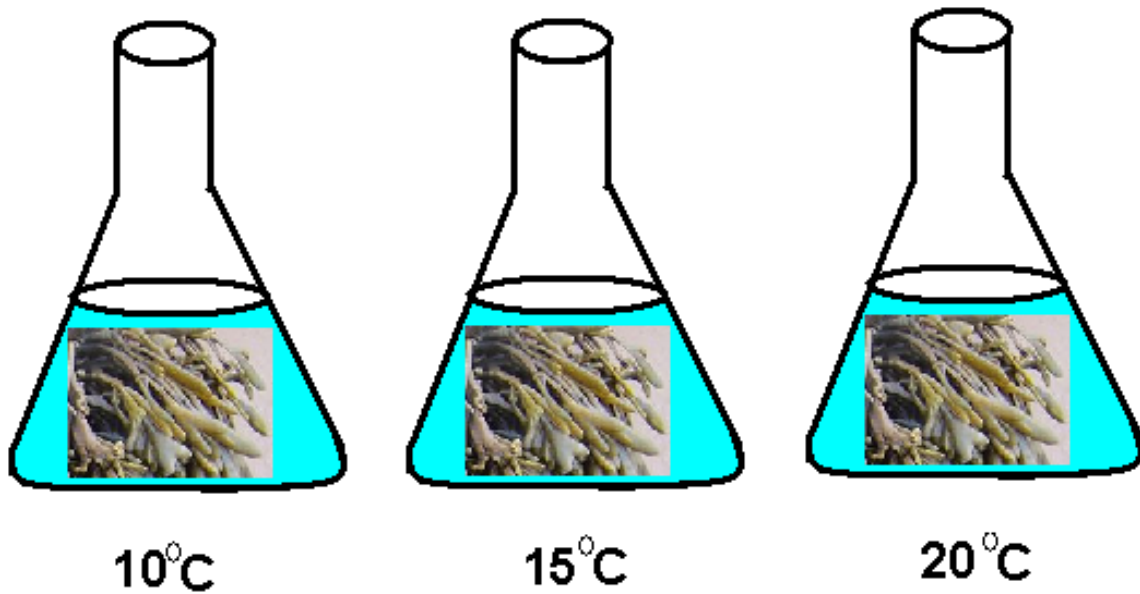


Figura III.4 Esquema que muestra los tratamientos a que se sometió *S. compressa*. Las temperaturas a las que se sometieron las plantas, se eligieron en función de las fluctuaciones de temperatura que ocurren naturalmente en el medio ambiente en que se desarrollan.

Se hicieron recambios de agua semanalmente con agua de mar natural sin filtrado adicional ni adición extra de nutrientes; las muestras correspondientes a cada temperatura se colectaron después de transcurrido un mes de permanencia de las plantas en las condiciones descritas. Cada muestra obtenida se secó en estufa de convección a 60°C hasta peso constante.

III.4.2 EXTRACCIÓN DE FUCOIDÁN

3 g de alga seca y molida se colocaron en 45 mL de HCl 0.2M y se extrajo bajo agitación en baño maría a 60°C por 120 minutos. La solución resultante se centrifugó por 5 minutos a 1,500 rpm y el residuo sólido se re-extrajo por 60 minutos adicionales con 30 mL de HCl 0.2M bajo las mismas condiciones de temperatura. Posteriormente,

se centrifugó, se combinaron las dos extracciones y se filtró a vacío para lo cual, se empleó tierra de diatomeas como facilitador de la filtración.

Para hacer más eficiente la precipitación, se incrementó la fuerza iónica de la solución filtrada agregando NaCl hasta lograr una concentración de 0.1 M. Al extracto se le agregan 3 volúmenes de etanol concentrado (cambio de polaridad del disolvente) con lo que precipita el polisacárido. Se centrifugó por 5 minutos a 1,500 rpm y para eliminar sales y agua, la pastilla obtenida se lavó dos veces por 30 minutos con 30 mL de etanol al 70% y dos veces con etanol concentrado, entre cada lavado se centrifugó para separar cada fase. Para evaluar el rendimiento, el producto obtenido, se secó a 60°C en estufa de convección por 72 horas y se pesó. Las extracciones se hicieron por triplicado.

III.4.3 FRACCIONACIÓN QUÍMICA DE LOS PS

Empleando las condiciones de extracción arriba descritas, se hicieron extracciones por triplicado. Cuando se obtuvo la solución clarificada, se neutralizó con NaOH 1M, el extracto obtenido se concentró por roto-evaporación hasta lograr una concentración aproximada de 1% (evaluado con la técnica de fenol-ácido sulfúrico). El extracto concentrado obtenido se separó en dos partes iguales para hacer la fraccionación con etanol al 50% con y sin sales de magnesio.

III.4.3.1 FRACCIONACIÓN CON SALES DE MAGNESIO- ETANOL

El extracto concentrado y neutralizado obtenido, se mezcló con un volumen igual de $MgCl_2$ 0.1M y se precipitó agregando un volumen de etanol concentrado. Se centrifugó para separar las fracciones soluble e insoluble. La fracción insoluble obtenida, se seca en estufa de convección a 60°C, mientras que a la fracción soluble resultante, se le agrega etanol concentrado hasta alcanzar una concentración superior al 70% en volumen, con ello precipitan los polisacáridos presentes (fracción soluble), se seca a

60°C. Una vez secas, ambas fracciones se analizaron por separado por espectroscopia de infrarrojo, carbohidratos totales, sulfatos, fucosa y ácidos urónicos.

III.4.3.2 FRACCIONACIÓN CON ETANOL SIN SALES DE MAGNESIO

Se siguió el protocolo del inciso anterior, solo que se omitió la sal de magnesio. Las fracciones obtenidas Insoluble y soluble respectivas se analizaron por espectroscopia de infrarrojo, carbohidratos totales, sulfatos, fucosa y ácidos urónicos.

III.4.4 ANÁLISIS QUÍMICOS

Carbohidratos totales en el extracto seco, se determinaron colorimétricamente por el método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) galactosa y fucosa se usaron como estándares.

Fucosa se midió colorimétricamente por el método de cisteína para deoxi-azúcares (Dische, 1955) con fucosa como estándar.

Ácidos urónicos se cuantificaron por el método modificado de carbazol (Bitter y Muir, 1962) usando ácido glucurónico como estándar.

Sulfatos se determinarán en un hidrolizado ácido del extracto seco, por el método turbidimétrico del Cloruro de Bario-Gelatina (Craigie y Wen, 1984) usando K_2SO_4 como estándar.

Cabe mencionar que en todas las técnicas analíticas espectrofotométricas, los análisis se ajustaron proporcionalmente a un volumen aproximado de 1 mL.

III.4.5 RAZÓN MOLAR DE COMPONENTES

Una vez que se evaluó el contenido de cada uno de los componentes del fucoidán, obtenido mediante las diferentes técnicas de fraccionación descritas, como una medida de comparación con el fucoidán de otras fuentes, se determinó la razón molar de sus componentes en relación a la fucosa (Fucosa:Sulfatos:Acidos Urónicos).

III.4.6 ESPECTROS DE INFRARROJO

De cada una de las muestras obtenidas por los diferentes procesos de fraccionación, se pesaron aproximadamente 3 mg del extracto seco. Se homogeneizaron con KBr sólido en un mortero de ágata, se prensó para formar una pastilla. El espectro de infrarrojo, se adquirió en modo de transmitancia en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , se hizo la integración de un total de 10 barridos en un espectrofotómetro FTIR- Perkin-Elmer modelo Spectrum 100.

III.4.7 FRACCIONACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Se preparó una columna de 1.5 x 12 cm con 7.5 g de resina de intercambio aniónico (DE-52) (volumen aproximado de 15 mL) (Figura 3.5); para evitar irregularidades en la superficie de aplicación, en la parte superior de la columna, se colocó una capa de fibra de vidrio. Pevio a la aplicación de la muestra, la resina se acondicionó lavando con 4 volúmenes de buffer de acetato 50 mM pH 5.

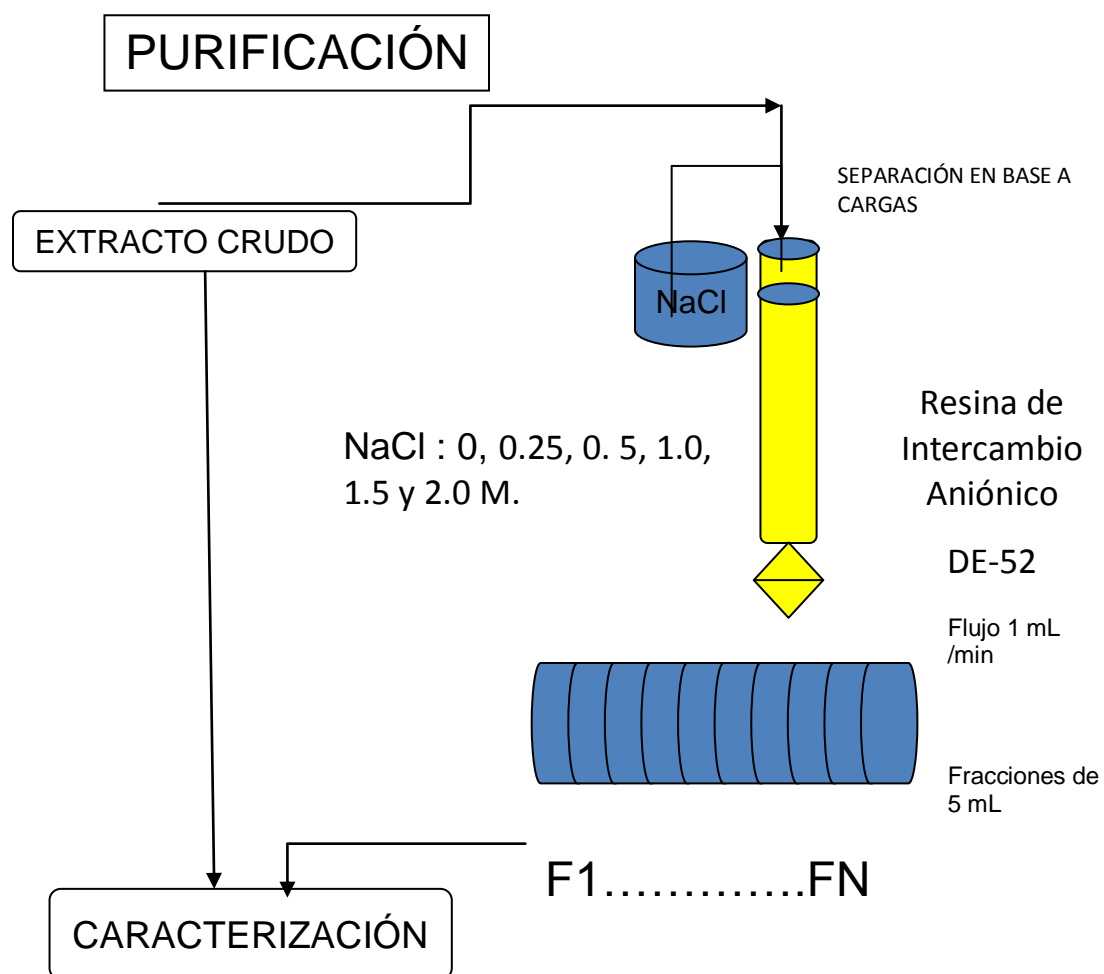


Figura 3.5 Esquema que muestra la fraccionación del fucoidán de *S. compressa* en una columna de resina de intercambio aniónico (DEAE-celulosa Whatman DE-52) de 1.5 x 12 cm.

La muestra del polisacárido, se preparó disolviendo 100 mg del extracto seco en 5 mL de buffer de acetato. Una vez disuelto, empleando una pipeta pasteur, se colocó en la parte superior de la columna. Para que la muestra quede embebida en la parte superior de la resina, se permitió el flujo a través de la columna hasta que deja libre la superficie. Para eluir el polisacárido a través de la columna, en primer instancia se aplicaron 30 mL (2 volúmenes en relación al volumen de la columna) del buffer de acetato y enseguida en forma secuencial, se aplicaron 30 mL de cada una de las soluciones salinas en concentración ascendente (NaCl 0.25, 0. 5, 1.0, 1.5 y 2.0 M, todas ellas preparadas con el buffer de acetato).

Se colectaron fracciones de 5 mL y en cada fracción colectada, se evaluó el contenido de azúcares totales (Dubois et al., 1956), fucosa (Dische, 1955) y ácidos urónicos (Bitter y Muir, 1962); en todos los casos se aplicó la micro-técnica (1 mL) descrita en párrafos anteriores.

III.5 RESULTADOS

Efecto de la temperatura de cultivo en el contenido y composición de los PS en el alga parda *Silvetia compressa*.

Las plantas se mantuvieron en la temperatura seleccionada por un periodo de dos meses; durante este periodo, se observó que la aereación para mantener el alga en movimiento dentro del matraz fue perjudicial, ya que en pocas horas se observó la presencia de tejido necropsado por lo cual se evitó la inyección de aire al matraz. Durante el primer mes de cultivo, las plantas en todas las temperaturas probadas, conservaron su apariencia saludable, no hubo incremento de biomasa pero tampoco se observó una disminución notable de la misma. Durante el segundo mes de cultivo, aunque el tejido se conservó saludable, la disminución de biomasa fue más evidente, particularmente en la temperatura de 15 y 20°C. Al finalizar el primer y segundo mes,

se separaron muestras de tejido de las plantas sometidas a cada temperatura, se secaron y molieron para su conservación y extracción posterior de los polisacáridos sulfatados; sin embargo debido a que durante el segundo mes hubo una disminución de biomasa, no se realizaron análisis de esas muestras.

El rendimiento de polisacáridos sulfatados obtenido de las muestras sometidas a diferentes temperaturas, en todos los casos hubo una disminución de 1 a 2% respecto al rendimiento inicial (Tabla III.1). Entre las diferentes temperaturas probadas, el menor rendimiento de 9.59% ocurrió a la temperatura más baja (10°C); aunque hubo un ligero incremento del rendimiento con el incremento de temperatura, las diferencias no son significativas (Tabla III.1).

En relación del contenido de sulfatos en el polisacárido de las muestras sometidas a las diferentes temperaturas, respecto del valor inicial solo incrementaron para el tratamiento a 10°C donde incrementó el contenido de sulfatos de 12.83% en la muestra inicial a 18.83% para 10°C. Por otra parte en los tratamientos a 15 y 20°C el contenido de sulfatos fue mucho menor que el correspondiente a 10°C y solo ligeramente mayor que el contenido mostrado por la muestra al inicio del experimento (Tabla III.1).

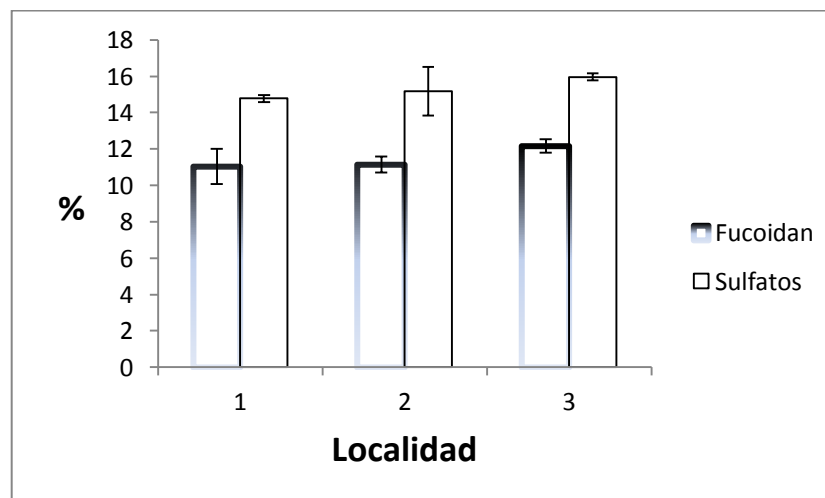


Figura 3.6 Contenido fucoidán de *Silvetia compressa* de tres localidades de Baja California y su contenido de grupos sulfato (1.- Eréndira 2.- San Quintín 3.- El Rosario). Donde las barras verticales muestran el error estandar, (n=3).

Tabla III.1 Rendimiento de polisacáridos sulfatados y su contenido de grupos hemiester sulfato, obtenido de muestras de *S. compressa* sometida a diferentes temperaturas (t= 30 días y n=3).

	Condición Inicial	10 °C	15 °C	20 °C
Rendimiento de PS (%)	11.59 ± 0.28	9.59 ± 0.92	10.13 ± 1.14	10.25 ± 0.02
Contenido de SO ₃ (%)	12.83 ± 0.32	18.87 ± 0.43	13.95 ± 0.13	13.65 ± 0.13

Respecto a las diferencias en composición de los polisacáridos en función del tejido, el análisis realizado en *S. compressa* mantenida en cultivo a 10°C. El menor contenido de sulfatos se obtuvo para el tejido nuevo (ápices), mientras que el fruto fue la parte más sulfatada (Tabla III.2).

Tabla III.2 Relación de componentes evaluado en los polisacáridos sulfatados de componentes del fucoidán de *Silvetia compressa* en función del tejido.

	CHOs	% Fucoidan	Sulfatos	Ac Uronicos
<i>Eisenia Juvenil</i>	5.7	2.4	4.5	3.3
<i>Silvetia Fruto</i>	9.8	10.0	4.2	2.1
<i>Silvetia Apices</i>	10.1	8.7	2.1	2.3
<i>Silvetia Estipe</i>	20.7	16.7	5.9	4.1
<i>Silvetia cultivo*</i>	7.4	6.3	1.8	1.5

Tabla III.3 Razón molar de componentes del fucoidán de *Silvetia compressa* en función del tejido.

TEJIDO	FUCOSA	SULFATOS	AC. URÓNICOS
Fruto	1.0	1.1	0.3
Ápices	1.0	0.6	0.4
Estipe	1.0	0.9	0.4
(Completa)	1.0	0.8	0.3

III.5.1 FRACCIONACIÓN CON ETANOL CON Y SIN MgCl₂.

El incremento de la concentración de etanol hasta un 50% del volumen total del extracto, provocó la separación de una fracción insoluble, mientras que la fase soluble remanente, al aumentar la concentración de etanol hasta aproximadamente un 70%, produjo un nuevo precipitado (soluble). Con la precipitación obtenida con etanol en la presencia de la sal de magnesio, el rendimiento de la fracción insoluble fue mayor que la fracción soluble (45.2 contra 54.8% respectivamente), mientras que sin MgCl₂ se presentó un comportamiento inverso (Tabla III.3).

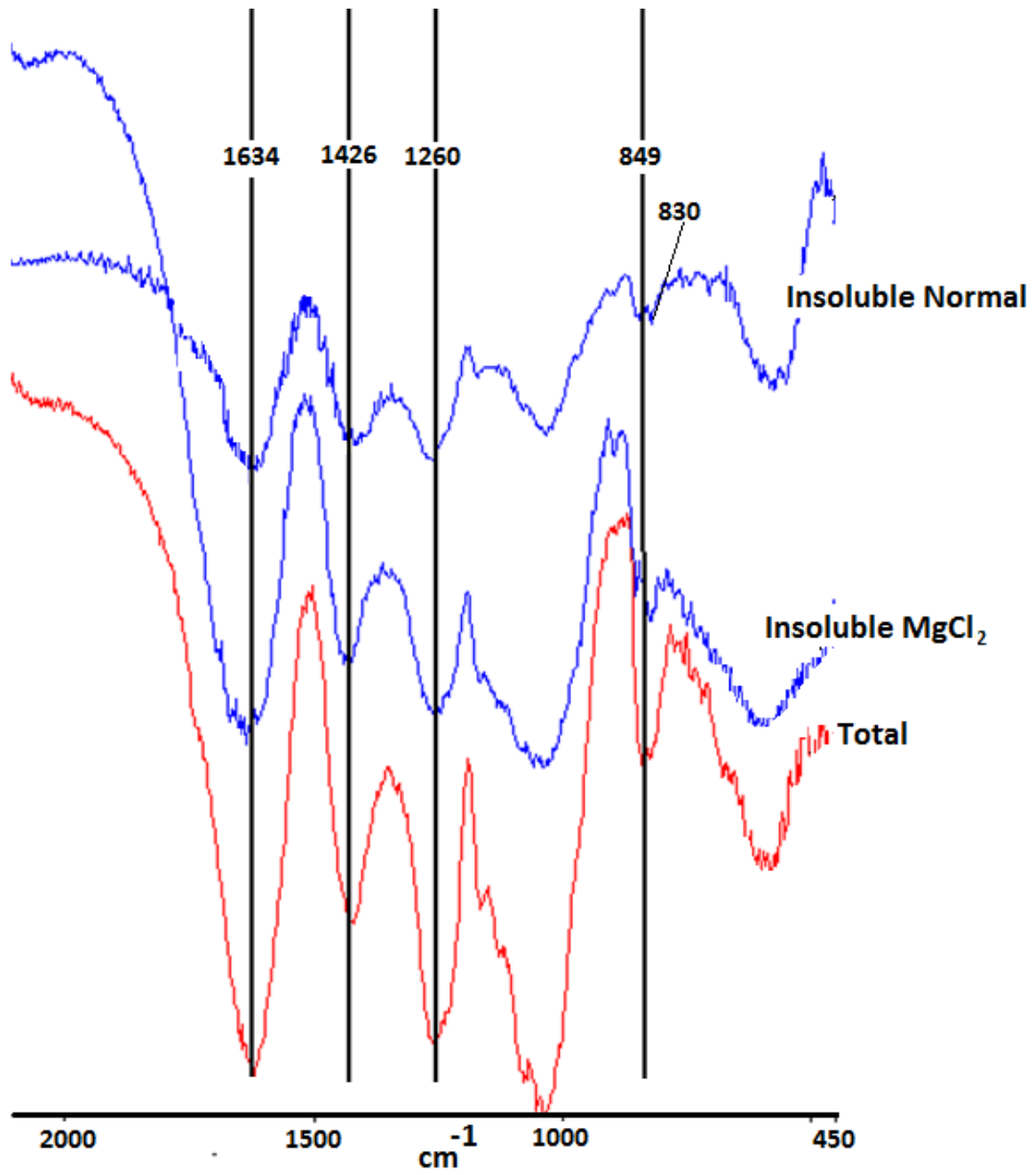
La diferencia en composición entre la fase insoluble y soluble fue clara; mientras que la fase insoluble, en los dos casos, contiene fucosa y grupos hemiéster sulfato y estuvo enriquecida con ácidos urónicos, en la fase soluble no se detectó la presencia de ácidos urónicos, esto en ambos tratamientos con y sin MgCl₂. El uso de la sal magnésica en la precipitación, resultó en una fracción soluble con mayor contenido de fucosa y grupos hemiéster sulfato, que la correspondiente fracción obtenida sin esta sal (Tabla III.3). La razón molar de componentes (Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos) muestra diferencias claras entre la fase soluble e insoluble, sin embargo las diferencias, son menos marcadas cuando se usan las sales de magnesio (Tabla III.3).

III.5.2 ESPECTROS DE INFRARROJO

Los espectros de infrarrojo obtenidos para las fracciones soluble e insoluble, en ambos casos muestran las señales características descritas para el fucoidán: 1614 y 1417 cm^{-1} relativas a grupos carboxilo de los ácidos urónicos, una señal fuerte a 1250 correspondiente a la vibración del enlace S=O y una señal a 840-850 cm^{-1} que se atribuye a un grupo sulfato en posición axial.

En la fracción soluble se puede apreciar un decremento de la señal a 1417 cm^{-1} , esto coincide con la ausencia de ácidos urónicos en esta fracción (Tabla III.3), este decremento en la mencionada señal fue más marcado en el espectro correspondiente a la fracción soluble obtenida con MgCl_2 (Fig. III.5a). De la misma manera, en esta fracción las señales correspondientes a los sulfatos 1250 y 840 cm^{-1} se incrementaron comparados al espectro del compuesto total y del obtenido para la fracción insoluble (Fig. III.5 a y b).

a) Fracción insoluble



b) Fracción Soluble

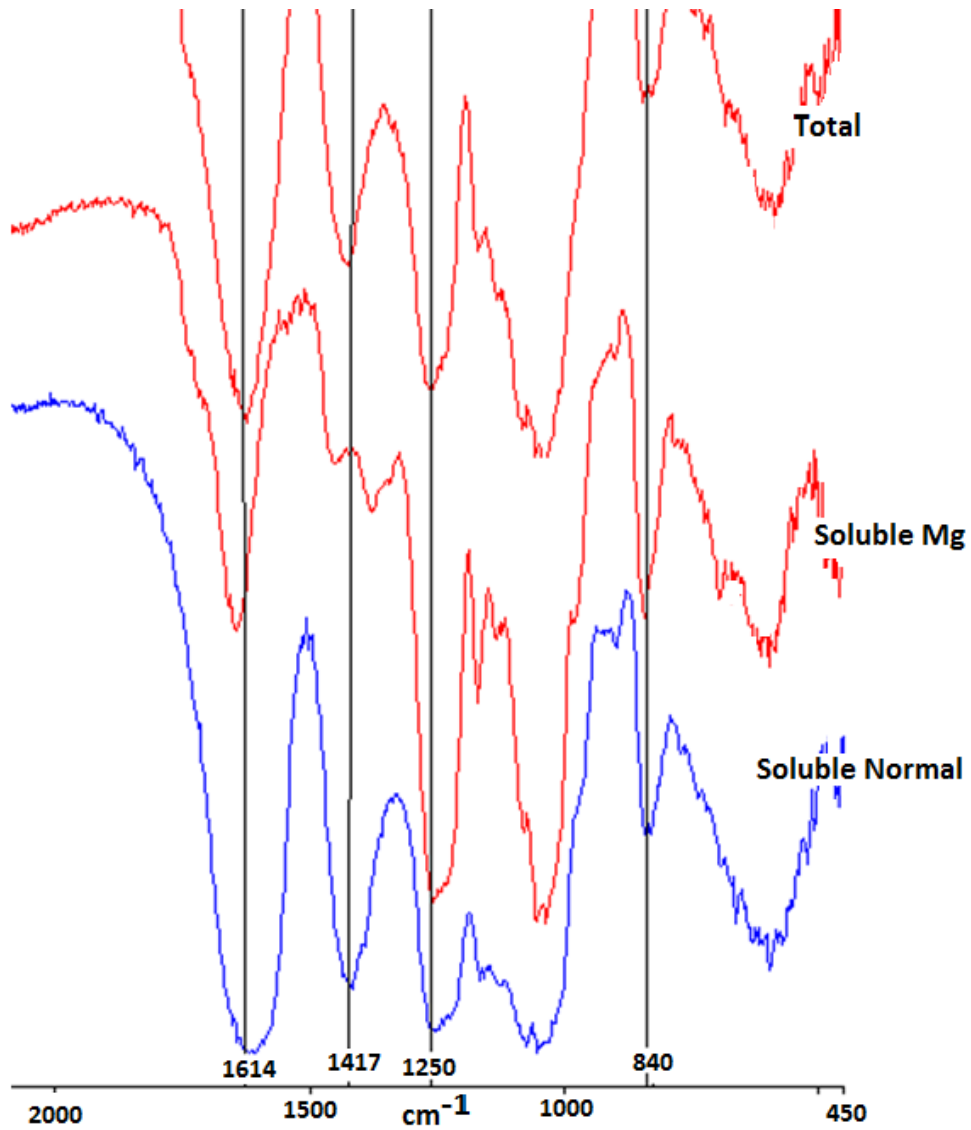


Figura 3.7 Espectros de infrarrojo del fucoidán obtenido mediante fraccionación con etanol con y sin MgCL₂; donde a) es la fracción insoluble y b) fracción soluble.

III.5.3 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO

Mediante la elución del polisacárido soluble de *S. compressa* a través de la resina de intercambio aniónico (DE-52) con un gradiente de NaCl de 0 a 2 M, se logró la separación de cuatro fracciones. La fracción I (tubos del 3 al 7) se obtuvo con buffer de acetato pH 5 sin NaCl, fue la fracción menor representó el 8.34% del total, esta fracción está formada por azúcares neutros. La fracción II, eluida con NaCl 0.5 M (tubos del 17 al 20) corresponde a un 12% del material, estuvo formada principalmente por ácidos urónicos. La fracción III, obtenida con con NaCl 1.0 M (tubos del 23 al 27), fue la fracción mayor con 64.87% del total, en esta fracción el azúcar principal fue la fucosa y contiene un bajo porcentaje de ácidos urónicos. La fracción IV eluida con NaCl 1.5 M (tubos del 29 al 32), representó 10.17% del total, formada exclusivamente de fucosa (Figura 3.8).

Tabla III.4 Composición química de las fracciones del fucoidán de *Silvetia compressa*, obtenidas mediante fraccionación con 50% de etanol con y sin sales de magnesio (MgCl_2 0.1M) (% \pm D. Estandar n=3).

FRACCIÓN	% del Total	FUCOSA	SULFATOS	AC. URÓNICOS
Insoluble MgCl_2	45.20	18.88 \pm 0.59	8.82 \pm 0.30	33.43 \pm 0.40
Insoluble 50% etanol	55.28	19.68 \pm 0.20	8.51 \pm 0.04	33.00 \pm 0.16
Soluble MgCl_2	54.80	44.50 \pm 0.64	22.17 \pm 0.83	0.00
Soluble 50% etanol	44.72	16.90 \pm 0.10	10.40 \pm 0.03	0.00

Tabla III.5 Razón molar de componentes (Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos) de las fracciones obtenidas del fucoidan de *S. compressa*.

	Fracción	Fucosa	Sulfatos	Ac.
				Urónicos
Magnesio	Soluble	1.00	0.90	0.00
	Insoluble	1.00	0.85	1.44
Etanol 50%	Soluble	1.00	1.12	0.00
	Insoluble	1.00	0.78	1.37

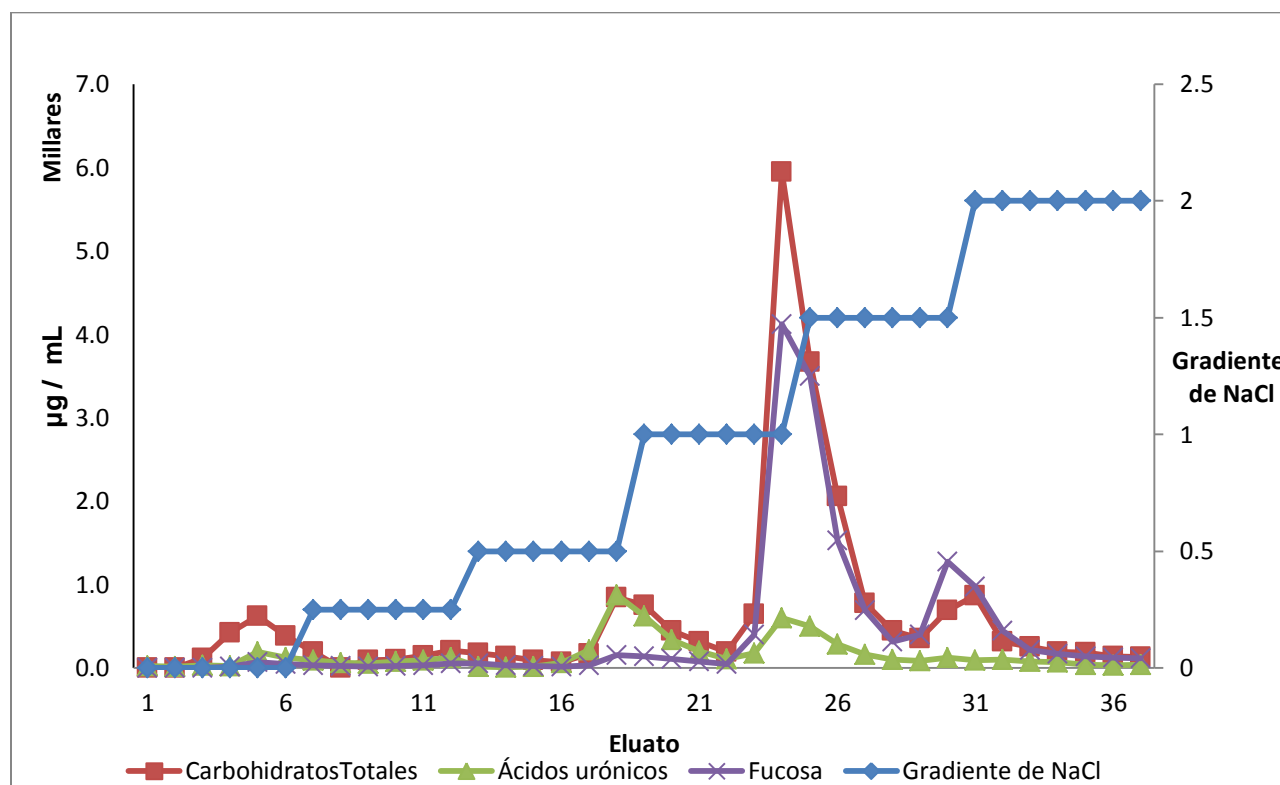


Figura 3.8 Fraccionación de fucoidán por cromatografía de intercambio aniónico: Separación de un extracto ácido (Fucoidán) de *Silvetia compressa* en columna de intercambio aniónico (DE-52) mediante un gradiente de concentración de NaCl (0-2M). Donde a) Azúcares totales b) Fucosa y c) Acidos urónicos.

III.6 DISCUSIONES

La pared celular de las macroalgas se caracteriza por contener abundantes polisacáridos de la matriz, los cuales se encuentran en mayor proporción que los polisacáridos de la pared celular. Estos polisacáridos, están formados principalmente por azúcares con carácter ácido (Painter, 1983). Dado que los factores ambientales influyen el crecimiento de las algas, éstos pueden tener un efecto sobre la química de la pared celular. Particularmente el alga parda *Silvetia compressa* que habita el extremo superior de la zona intermareal, aparte de estar expuesta a fluctuaciones extremas de temperatura e irradiancias, el estrés físico impuesto por la emersión de la marea es particularmente severo para esta especie (Davidson y Pearson, 1996). *S. compressa* similar a lo que ocurre con otras especies de las fucales, puede estar expuesta al aire por períodos de más de 8 horas y aún así mantiene su habilidad para realizar fotosíntesis. Por otra parte, se desconoce con precisión el mecanismo por el cual estas especies pueden tolerar el estrés osmótico extremo; sin embargo algunas investigaciones sobre la fisiología de algas intermareales, identifican a los carbohidratos intracelulares como compuestos osmóticamente activos (McCully, 1968; Iwamoto y Shiraiwa 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran que factores ambientales, como la temperatura influyen en el metabolismo de las macroalgas, en este caso se observó que variaciones en la temperatura a que fue sometida el alga parda *S. compressa*, produjo cambios en el contenido y composición de los polisacáridos sulfatados de la pared celular (fucoidán).

Durante los 30 días que duró el tratamiento, se observó una ligera reducción en relación al valor inicial en el rendimiento (11.59%) para todas las temperaturas ensayadas de 10, 15 y 20°C (9.59, 10.13 y 10.25% respectivamente). Las diferencias en rendimiento entre los tratamientos fue mínimo (Tabla IV.1); sin embargo si se observó un afecto sobre el contenido de sulfatos. El contenido de sulfatos de la

muestra inicial 12.83 ± 0.32 % incrementó 6% sometida a 10°C, mientras que el incremento a 15 y 20°C fue muy ligero. A pesar de que hubo muy poco cambio con las diferentes temperaturas, la tendencia que se observa, es que ocurre una disminución del contenido de sulfatos al incrementar la temperatura de cultivo. En el alga verde *Ulva clathrata* cultivada a diferentes temperaturas, se encontró un comportamiento similar en el contenido de sulfatos, donde ocurre una relación inversa entre el contenido de sulfatos y la temperatura (Mesa-Soria, 2006); lo anterior, contrasta con el comportamiento para algas agarofitas y carragenofitas, donde el contenido de sulfatos en agar y carragenanos, incrementan con la temperatura en la que crece la planta (Kloareg y Quatrano, 1988; Craigie, 1990).

Respecto a las diferencias encontradas en función del tejido, el tejido más joven (ápices) mostró el menor contenido de sulfatos, esto coincide con los trabajos de Quatrano y Stevens (1976), que encontraron que al momento en que ocurre la fertilización del cigoto, se inicia la formación de la pared celular, donde inicialmente solo se encuentra celulosa y alginatos y carece de fucosa (< 1 h); pero a medida que pasa el tiempo, ocurre un incremento paulatino en el contenido de fucosa y su proporción de sulfatos (≥ 12 h), este comportamiento continúa, hasta que la planta posee un alto contenido de fucosa sulfatada (Quatrano y Stevens, 1976) (Tabla IV.2).

En función de la localidad geográfica, también ocurrieron cambios; se observa un ligero incremento en el contenido, donde ocurre un gradiente de norte a sur (Fig. 3.2). Lo anterior, de acuerdo al efecto observado en la temperatura, se pudiera inferir, que temperaturas menores ocurren en la localidad más sureña (El Rosario), esto pudiera de algún modo justificarse por el hecho de que en esta localidad, durante el año ocurren surgencias en forma recurrente (Durazo y Baumgartner, 2002). Sin embargo el comportamiento observado no debe considerarse concluyente, debido a que en el medio ambiente natural, están implicados muchos factores que afectan en general el metabolismo algal (temperatura, nutrientes, irradiancias, periodos de emersión, etc), por ello sería necesario realizar un análisis donde se evalúe composición y rendimiento de PS en relación directa con factores ambientales bien delimitados.

Por otra parte, tanto la composición química, como la razón molar (Fucosa: Sulfatos: Ac. Urónicos) obtenida en este estudio (Tabla III.2 y III.3) muestran claramente que los polisacáridos solubles de *S. compressa*, corresponden a fucanos sulfatados que contienen ácidos urónicos en su composición. Tal como lo describen otros autores (Percival and Ross, 1950; Schweiger, 1962, Larsen *et al.*, 1966; Medcalf *et al.*, 1978; Kloareg *et al.*, 1986).

Este estudio comprueba que los polisacáridos solubles de *S. compressa*, es un grupo heterogéneo de macromoléculas y por lo tanto, pueden ser separados por diferentes técnicas cromatográficas; por ejemplo en función del tipo y densidad de cargas que posee, ya que esto se relaciona directamente con la solubilidad de las macromoléculas (Smidsrod, 1967; Kloareg *et al.*, 1986; Rinaudo, 2006).

En congruencia con el precepto anterior, la precipitación fraccional realizada en este estudio con etanol y etanol-MgCl₂, se logró separar fracciones de composición diferente. Una fracción insoluble se obtuvo con etanol al 50%, esta, fue la fracción con el menor grado de sulfatación, pero con mayor contenido de ácidos urónicos (U-Fucoidán); mientras que la fracción que permaneció soluble, fue más alta en grupos hemiester sulfato y menor o nulo contenido de ácidos urónicos (F-Fucoidán) (Tabla III.3) esta última fracción, se asemeja en composición a la definición estricta del fucoidán (Larsen *et al.*, 1966; Larsen, 1967; Mian y Percival, 1973; Hogsett y Quatrano, 1975; Larsen, 1978; Bilan *et al.*, 2006).

Este comportamiento va de acuerdo con lo establecido en párrafos anteriores de que mayores contenidos de grupos hemiester sulfato confieren mayor solubilidad; es por ello que la fracción con mayor contenido de sulfatos requiere cantidades mayores de solvente para inhibir la solubilidad de estos polisacáridos sulfatados (Kloareg *et al.*, 1986). Es también necesario puntualizar que el uso de las sales de magnesio (MgCl₂) para promover la precipitación, resultó en la obtención de fracciones más homogéneas (Figura 3.b), ya que el magnesio (metal divalente) se une a los grupos carboxilo de unidades monoméricas de los ácidos urónicos, provocando con ello una precipitación

más eficiente de la fracción que contiene ácidos urónicos con el cambio de solvente (Larsen *et al.*, 1966; Larsen, 1978).

Mediante el empleo de cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-52), se logró también demostrar que los polisacáridos solubles de las algas pardas están formados por grupos de polisacáridos de composición diferente que va, desde la presencia de azúcares neutros (probablemente fracciones de laminarín o celulosa) con poca o nula retención en la matriz de la resina, hasta polisacáridos altamente iónicos; lo anterior en base al patrón de elución obtenido (Fig. 3.6) donde polisacáridos con una mayor densidad de cargas negativas (sulfatos o ácidos urónicos) poseen mayor afinidad a la resina aniónica y por lo tanto esa fracción tendrá una mayor retención.

De acuerdo al orden de elución obtenido con la resina de intercambio aniónico (DEAE-52) (Fig. 3.6), la fracción I corresponde a azúcares neutros, mientras que la fracción IV con la mayor retención dentro de la columna y que fue eluída con la concentración más alta de NaCl (1.5 - 2 M) debe corresponder a un polisacárido con una alta densidad de cargas negativas. Al no detectarse ácidos urónicos en esta fracción (Fig. 3.6), se infiere entonces que la densidad de cargas en la molécula, se debe exclusivamente a la presencia de grupos hemiester sulfato, lo cual en el sentido estricto también concuerda con la definición de fucoidan (Larsen, 1978, Bilan *et al.*, 2006).

Debido a que quedó demostrada la heterogeneidad de los PS de algas pardas; la composición, varía de acuerdo a la fuente, entonces para un aprovechamiento óptimo de estas sustancias, es necesario obtener a partir de diferentes especies algales, extractos purificados de composición definida con los que se realicen bioensayos, mismos que permitirán evaluar de forma precisa la bioactividad de cada componente.

CAPÍTULO IV

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS POLISACÁRIDOS SOLUBLES DEL ALGA VERDE *ULVA CLATHRATA* (ROTH) C. AGARDH.

IV.1 Introducción.....	86
IV.2 Hipòtesis.....	89
IV.3 Objetivo.....	89
IV.3.1 Objetivo general.....	89
IV.3.2 Objetivo particular.....	89
IV.4 Materiales y métodos.....	89
IV.4.1 Materias primas.....	89
IV.4.2 Extracciòn.....	90
IV.4.2 Anàlisis.....	92
IV.5 Resultados.....	94
IV.6 Discussiòn.....	99

IV.1 INTRODUCCIÓN

Las algas verdes y en particular las especies de *Ulva*, tienen una distribución mundial; crecen en las zonas intermareal y submareal, adheridas a sustrato rígido, aunque se pueden desarrollar bien en forma libre. Las especies de *Ulva*, son consideradas especies oportunistas y proliferan en aguas costeras eutroficadas (Borowitzka, 1972; Teichberg *et al.*, 2010).

A diferencia de las otras divisiones algales (rodofitas y faeofitas) donde muchas de las especies son ampliamente utilizadas, para las clorofitas los usos es más limitado. Entre sus principales aplicaciones, encontramos que en Japón, algunas especies de *Ulva* son usadas como alimento ej. el producto comercial, conocido como “aonori” o “green laver” es una mezcla de las algas *Ulva pertusa*, *Enteromorpha prolifera* *Monostroma latissimum* (Nisizawa *et al.*, 1987). También en Europa, *Ulva* ha tenido aplicaciones en alimento para aves ya que mejora la coloración de la carne y de la yema de huevo (Indergaard y Minsaas, 1991).

A pesar de que las algas verdes son una fuente importante de polisacáridos complejos, hasta el momento no se ha identificado ningún hidrocoloide de importancia comercial. En el caso particular de las especies de *Ulva* están, los polisacáridos presentes, están formados por cuatro familias, dos principales, el ulvano soluble y la celulosa insoluble; así como dos menores, el xiloglicano lineal soluble en álcali, así como un glucuronano (Lahaye y Robic, 2007). Mientras que la celulosa, es un polisacárido lineal neutro, el ulvano es un polisacárido aniónico, sulfatado, soluble en agua. Está formado principalmente por el azúcar ramnosa (6-deoxi-manosa), grupos sulfato y ácidos urónicos (Percival y McDowell, 1967; Medcalf *et al.*, 1972; Robic *et al.*, 2009); ocurre principalmente como ácido aldobiturónico (4-O- β -D-glucuronosil- α -L-ramnosa) o como ulvanobiosas, donde los ácidos urónicos son reemplazados por la 1-4 β -D-xilosa o la xilosa 2-sulfato (Lahaye, 2001) (Fig. IV.1).

Las propiedades biológicas y fisicoquímicas del ulvano son altamente dependientes de su composición química, azúcares componentes, densidad de cargas y de su peso molecular. Tal como ocurre en otras divisiones algales, en las algas verdes, el rendimiento y composición de sus polisacáridos, es dependiente de las especies de las cuales se obtiene y es afectado por las condiciones ambientales en donde se desarrollan (Lahaye y Robic, 2007), la estación del año (Abdel-Fattah y Edrees, 1973; Lahaye *et al.*, 1999; Medcalf *et al.*, 1975; and Robic *et al.*, 2009c), así como el método de extracción empleado (Percival, 1964; Medcalf, 1975; Ray y Lahaye, 1995; Robic *et al.*, 2008).

En relación a los usos en México, particularmente en el estado de Sinaloa, el alga verde *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh, se ha estado empleando como alimento directo en las granjas de camarón, bajo el argumento aún no probado de que esta especie es un auxiliar en la prevención de la incidencia del virus de la mancha blanca (Cruz-Suárez *et al.*, 2009). La bioactividad anterior, puede atribuirse a la presencia en estas algas de polisacáridos sulfatados, ya que a éstos compuestos se le atribuyen varias actividades biológicas y fisiológicas, tales como anticoagulante, antihiperlipidémico, antiviral, antitumoral y antioxidante, entre otras (Pereira *et al.*, 1999; Collicet *et al.*, 1994).

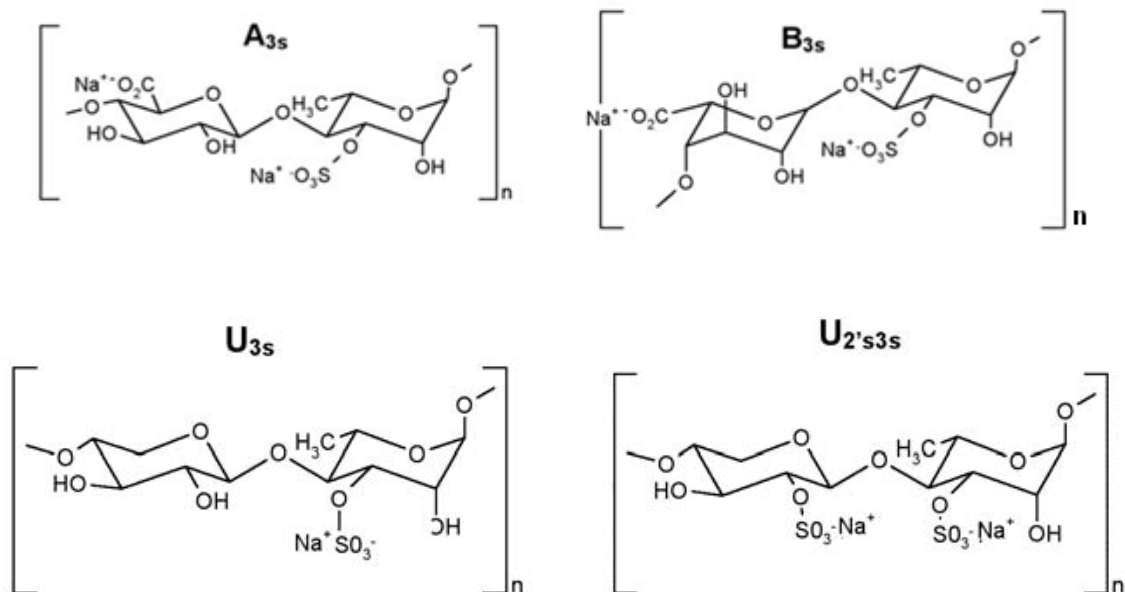


Figura 4.1 Estructura de las principales estructuras disacáridas repetitivas presentes en los polisacáridos de *Ulva* (ulvano); los ácidos ulvanobiurónicos A3s y B3s y las ulvanobiosas U3s y U's3s (Lahaye, 2001).

IV.2 HIPÓTESIS

Las algas verdes dentro de su pared celular, poseen una mezcla de polisacáridos de estructura compleja, éstos, interaccionan entre sí, mediante diferentes uniones como, ionicas, puentes de hidrógeno, etc., de ésta manera permanecen dentro de la planta cumpliendo su función estructural. De la mezcla de polisacáridos presentes en *Ulva clathrata*, mediante el uso de diferentes medios, como, el agua, EDTA y HCl, es posible solubilizar polisacáridos de composición diferente.

IV.3 OBJETIVO

IV.3.1 OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de los polisacáridos presentes en el alga verde *Ulva clathrata*.

IV.3.2 OBJETIVO PARTICULAR

Evaluar el efecto del medio de extracción en la composición de los polisacáridos solubles del alga verde *U. clathrata*.

IV.4 MATERIALES Y MÉTODOS

IV.4.1 MATERIAS PRIMAS

Ulva clathrata, se colectó en una poza de cultivo de camarón en Los Mochis, Sinaloa México, ubicada en las coordenadas: 25° 35' 28" Lat N, 109° 05' 54" Long W (Fig. IV.2). La muestra colectada, se secó a la sombra y se molió (tamaño ≤ 0.5 mm); para su

almacenamiento se colocó en bolsas de plástico y se conservó a temperatura ambiente para sus análisis.

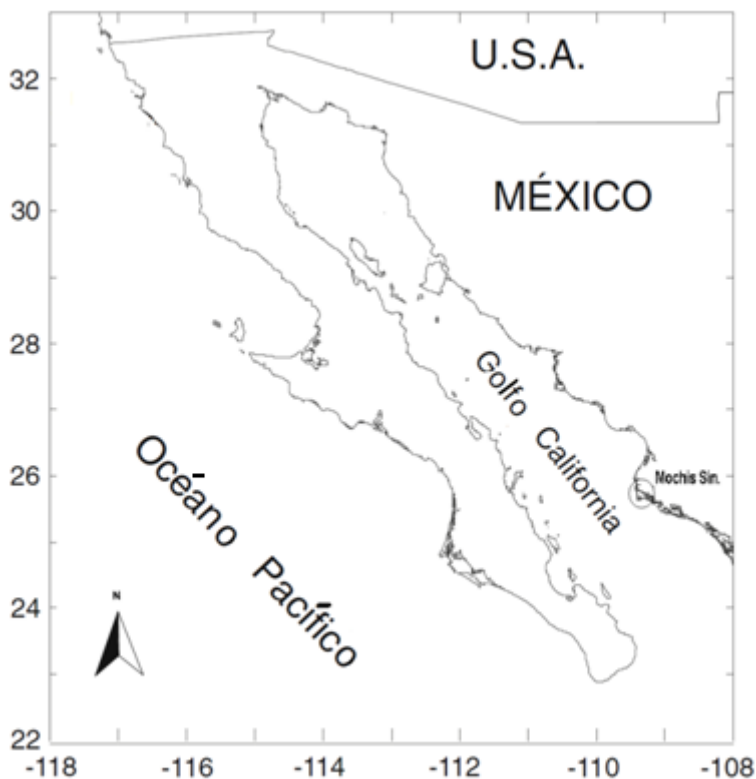


Figura 4.2 Localidad de colecta de *Ulva clathrata*. Proviene de una granja comercial productora de camaron en Mochis, Sinaloa, México.

IV.4.2 EXTRACCIÓN

Los polisacáridos solubles de *U. clathrata* se obtuvieron en dos fracciones extraídas secuencialmente; el desarrollo experimental se muestra en la figura IV.3. Se procesaron por triplicado muestras de 2 g de *U. clathrata* molida y seca; donde la fracción 1 (F-I) se obtuvo extrayendo con 3 soluciones diferentes: a) agua, b) ácido etileno diamino tetra acético, sal disódica (Na_2EDTA) y c) HCL 0.2N; para la extracción, se colocaron en 20 mL del medio respectivo (1:10 peso/volumen), se mantuvieron en agitación por dos horas dentro de un baño maría a 60°C. Se centrifugó y se colectó el sobrenadante, mientras que el material residual se re-extrajo por 60 minutos adicionales con 20 mL del mismo medio; se centrifugó y el sobrenadante se mezcló con

el obtenido en la primer extracción, mientras que el alga residual se separó para realizar la extracción secuencial. La fracción soluble combinada de las dos extracciones, se filtró a vacío con tierra de diatomeas y se precipitó con 3 volúmenes de etanol. El precipitado obtenido, se recuperó por centrifugación y se lavó 3 veces con 15 mL de etanol al 70% (v/v) y 2 veces con 15 mL de etanol concentrado; para determinar el rendimiento, se secó en estufa de convección a 60°C hasta peso constante.

El material residual de cada una de las extracciones anteriores se utilizó para realizar la extracción secuencial en solución alcalina (NaOH) (Fig. 4.3). La fracción 2 (F-II) se obtuvo al tratar el alga residual de cada uno de los tratamientos anteriores; con 20 mL de NaOH 0.1 M en un baño maría a 60°C por dos horas; el extracto obtenido se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm, se colectó el sobrenadante, se filtró a vacío con tierra de diatomeas y se precipitó en forma similar a la fracción F-I con 3 volúmenes de etanol, se recuperó como se describió en la fracción anterior.

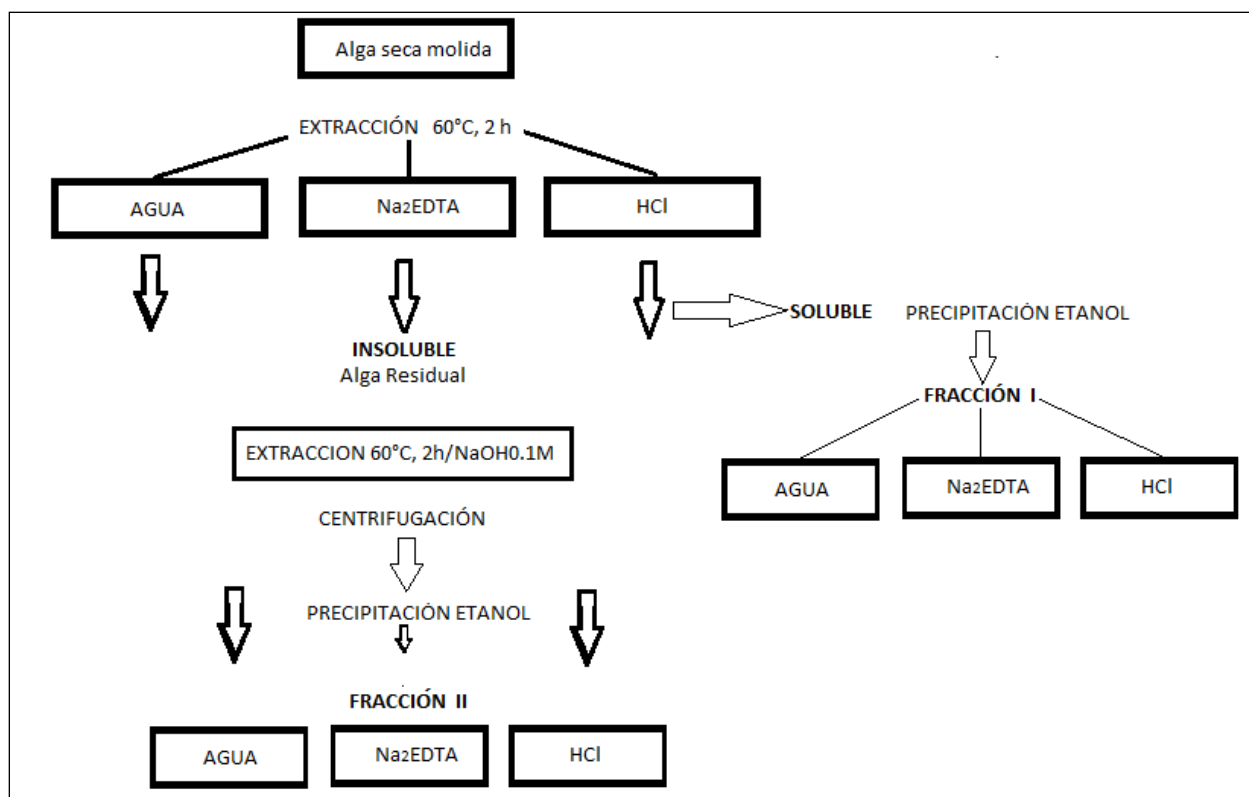


Figura 4.3 Diagrama de flujo que muestra la extracción secuencial de polisacáridos solubles del alga verde *Ulva clathrata*.

IV.4.3 ANÁLISIS

Del extracto seco obtenido de cada fracción, se prepararon soluciones en agua a una concentración apropiada para análisis ej 100 µg/mL.

Carbohidratos totales, se estimaron por el método espectrofotométrico del fenol-ácido sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) galactosa y ramnosa se usaron como estándares. Brevemente, en puebas por duplicado en tubos de ensayo de 16 x 20 mm se colocó 1 mL de muestra o estándar (0 a 100µgr), se le adicionaron 250 µL de solución de fenol al 3% y en forma rápida 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se reposa por 30 minutos y se lee absorbancia a 485 nm.

Ramnosa, se midió colorimétricamente por el método de cisteína para deoxi-azúcares (Dische, 1955), ramnosa se usó como estándar.

Ácidos urónicos se cuantificaron por el método de carbazol (Bitter y Muir, 1962) ácido glucurónico se usó como estándar.

Proteínas se determinaron por el método de Bradford (Bradford, 1976), albúmina de suero de bovino (BSA) se empleó como estándar.

Grupos sulfato, se determinaron por el método turbidimétrico de cloruro de bario-gelatina, donde el K_2SO_4 se usó como estándar (Tabatabai, 1974, modificado por Craigie y Wen, 1984).

El espectro de infrarrojo se adquirió en un espectrofotómetro FTIR-100 Beckman, para lo cual se usaron aproximadamente 3 mg del extracto seco de cada fracción. La muestra correspondiente se homogeneizó en un mortero de ágata con bromuro de potasio (KBr) sólido; se formó una pastilla por medio de una prensa. El espectro de infrarrojo se adquirió en modo de transmitancia en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} con resolución de 4 cm^{-1} ; para cada muestra, se realizaron 10 barridos y los espectros se obtuvieron aplicando transformadas de Fourier.

Se realizó resonancia magnética nuclear de protón ($RMN-H^1$), para ello aproximadamente 5 mg del extracto seco de *U. clathrata*, se disolvieron en agua deuterada (D_2O) y el espectro se adquirió a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro Varian FT H-NMR a 300 MHz. Los desplazamientos químicos se expresaron en partes por millón (ppm).

IV.5 RESULTADOS

El alga verde *U. clathrata* posee aproximadamente un 20% de polisacáridos solubles en agua. El rendimiento y composición de los polisacáridos obtenidos en una extracción secuencial, varían entre los métodos de extracción empleados. En todos los casos probados, el rendimiento obtenido en la primera fracción (F-I) (agua, Na₂EDTA y HCl) fue mayor que el rendimiento obtenido en la segunda fracción (F-II) que corresponde a la extracción secuencial en NaOH (Fig. IV.4). El mayor rendimiento de polisacáridos solubles en F-I se obtuvo en la extracción con HCl (14.83%), mientras que en la extracción en agua fue el menor rendimiento (7.72%). La extracción secuencial en NaOH, siguió el mismo comportamiento, donde la extracción correspondiente al ácido fue la mayor con 5.92% y la extracción secuencial del agua fue la menor con un 2.67% (Tabla IV.1).

En relación a la composición, esta fue diferente tanto entre tratamientos en cada fracción, así como entre las 2 fracciones obtenidas.

El contenido de carbohidratos totales cuantificado, se mantuvo en un rango similar para ambas fracciones F-I y F-II (de 26.68 a 44.62% y de 27.03 a 43.27% respectivamente); sin embargo, si hubo diferencias en el contenido sulfatos, proteínas y en azúcares componentes (ramnosa y ácidos urónicos).

En todos los casos, la fracción F-I, fue más sulfatada (de 27.87 a 35.8%) y tuvo un contenido ligeramente mayor de ramnosa (16.99 a 32.52%) que lo encontrado en la fracción F-II (5.61 a 7.36% para sulfatos y 14.01 a 25.91 para ramnosa).

Por otra parte la fracción correspondiente a la extracción secuencial alcalina (F-II), fue mayor en contenido de proteínas (8.41 a 9.07%) y ácidos urónicos (8.95 a 13.35%) que los encontrados en F-I (0.39 a 0.56% y 7.15 a 11.55% respectivamente) (Tabla IV.1).

En la tabla IV.2, se muestra la razón molar entre los componentes, calculada a partir de los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla IV.1 Composición química de los polisacáridos soluble de *U. clathrata*, extraídos en medios diferentes (agua, Na₂ EDTA y HCl) Fracción I y Fracción II obtenida por extracción secuencial con NaOH 0.1 M (n=3).

	Fracción I			Fracción II		
	Agua ₍₁₎	EDTA ₍₂₎	HCL ₍₃₎	NaOH ₍₁₎	NaOH ₍₁₎	NaOH ₍₃₎
Rendimiento	7.72 ± 1.1	10.89 ± 1.0	14.83 ± 1.5	2.67 ± 0.2	3.44 ± 0.3	5.96 ± 1.0
Proteinas	0.56 ± 0.1	0.51 ± 0.1	0.39 ± 0.1	8.41 ± 1.3	9.07 ± 1.3	8.72 ± 1.1
Carbohidratos	26.68 ± 2.2	30.49 ± 2.9	44.62 ± 1.1	27.03 ± 1.6	32.06 ± 0.8	43.27 ± 2.0
Totales						
Ramnosa	16.99 ± 1.2	20.33 ± 1.2	32.52 ± 0.5	14.01 ± 1.9	17.53 ± 0.9	25.91 ± 1.1
Sulfato	35.80 ± 1.1	32.52 ± 0.9	27.87 ± 0.8	5.61 ± 0.5	6.06 ± 0.2	7.36 ± 0.3
Acidos Urónicos	7.15 ± 0.8	7.51 ± 0.5	11.55 ± 0.2	8.95 ± 0.6	10.52 ± 1.2	13.35 ± 1.3

Tabla IV.2 Razón molar de componentes (Ramnosa: Sulfatos: Ácidos Uronicos) calculada para las fracciones F-I y F-II obtenidas por extracción secuencial de *U. clathrata*.

Medio	Fracción I			Fracción II		
	Ramnosa	Sulfatos	Ácidos Urónicos	Ramnosa	Sulfatos	Ácidos Urónicos
Agua	1.0	2.9	0.3	1.0	0.5	0.5
EDTA	1.0	2.3	0.3	1.0	0.5	0.5
HCL	1.0	1.2	0.3	1.0	0.4	0.4

Tabla IV.3 Razón molar teórica (Ramnosa: Sulfatos: Ácidos Urónicos: Xilosa) y el contenido (%) en base a las estructuras idealizadas del ulvano, propuestas por Lahaye (2001).

Estructura idealizada Ulvano	%				Razón Molar			
	Ramnosa	Sulfatos	Ácidos Urónicos	Xilosa	Ramnosa	Sulfatos	Ácidos Urónicos	Xilosa
1 A 3_s	34	24	41	0	1	1	1	0
2 B 3_s	34	24	41	0	1	1	1	0
3 U 3_s	38	27	0	35	1	1	0	1
4U2' s 3_s	30	43	0	27	1	2	0	1

Los espectros de infrarrojo (FTIR) muestran señales similares para las 2 fracciones secuenciales F-I y F-II, sin embargo el espectro para la primer fracción F-I (Fig. 4.3a) fue más complejo que el correspondiente para la fracción alcalina F-II (Fig. 4.3b). Se presentan dos bandas una a 1646 y la otra a 1410 cm^{-1} , las cuales corresponden al grupo carboxilo (C=O), la primer señal se desplaza a 1750 cm^{-1} en el extracto ácido correspondiente (Fig. 4.3b³). Es notoria una señal fuerte a 1260 debida a la vibración del enlace del éster sulfato (S=O), se detecta también una señal fuerte a 1055, la cual es común para todos los polisacáridos sulfatados y dos señales menores, una relacionada a un grupo sulfato en posición axial a 840 cm^{-1} y otra a 790 cm^{-1} , relacionada a los azúcares cíclicos (Robic *et al.* 2009a) (Fig. 4.3a, b).

El espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN- H^1) obtenido para la fracción correspondiente al extracto ácido F-I de *U. clathrata* se muestra en la Figura 4.4. Muestra las señales características para los protones de azúcares; en particular la señal con desplazamiento químico de 5.36 ppm, pudiera atribuirse a la presencia de protones asociados a grupos sulfato, además, hay una señal principal en campo alto a 1.26 ppm, esta es congruente con la presencia de los protones del metilo de los deoxi-azúcares como la ramnosa (Mao *et al.*, 2006)

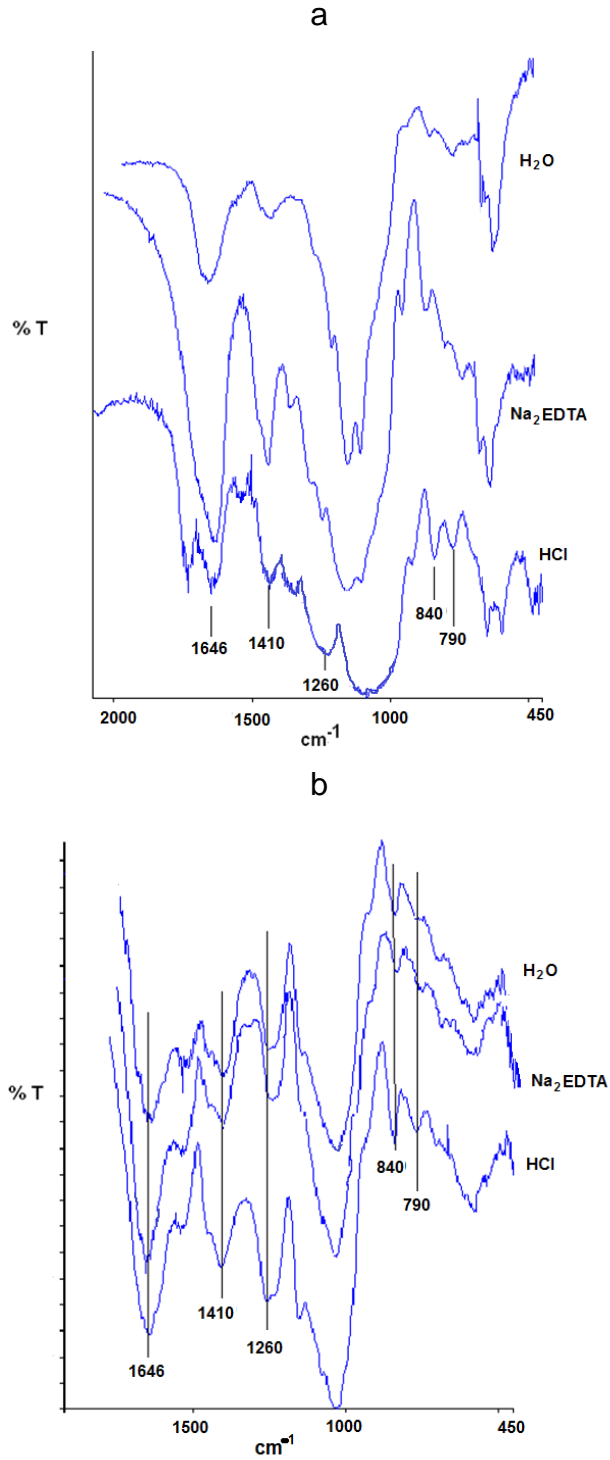


Figura 4.4 Espectro de infrarrojo (IR) obtenido de extractos aislados de *Ulva clathrata*, donde a y b corresponden a los espectros de las fracciones F-I y F-II respectivamente. En cada fracción, los números de los espectros 1,2 y3, corresponden al medio de extracción, agua, Na₂EDTA y HCL respectivamente.

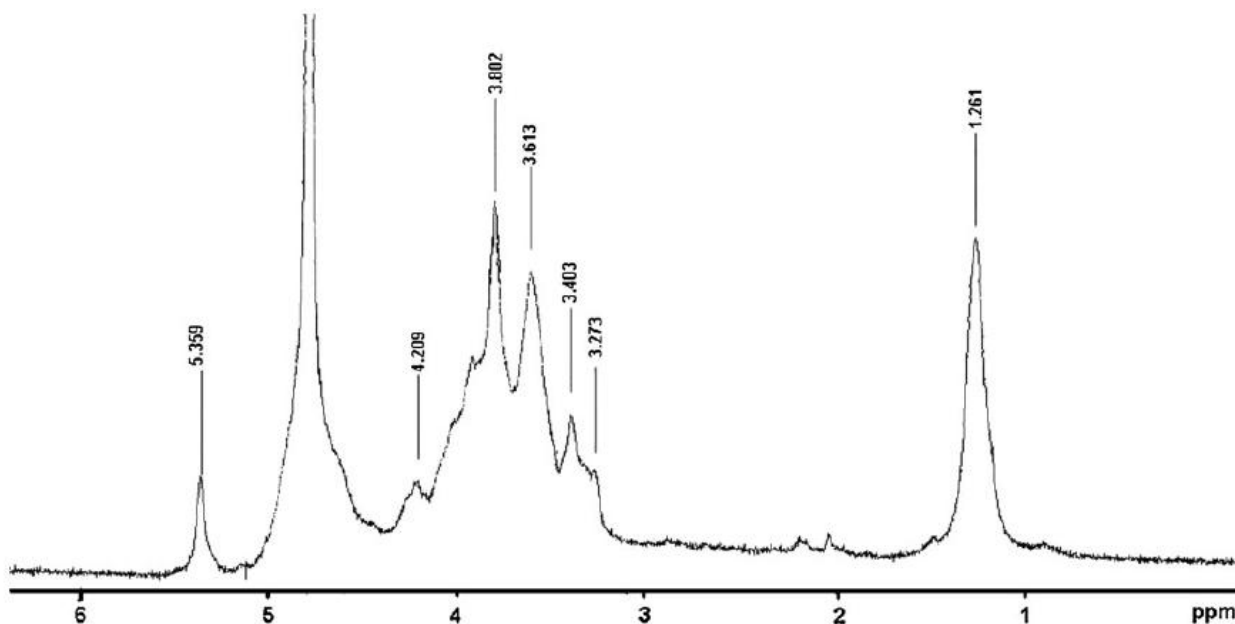


Figura 4.5 Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN-H¹) de los polisacáridos soluble en HCl, aislados de *Ulva clathrata*.

IV.6 DISCUSIONES

Las algas pertenecientes a las clorificas, son una fuente importante de polisacáridos solubles en agua, en particular a los polisacáridos obtenidos de las Ulvales, se les ha aplicado el término de ulvanos (Lahaye y Robic, 2007).

En este estudio se extrajeron secuencialmente los polisacáridos solubles del alga verde *Ulva clathrata*, donde una primer fracción (F-I) se obtuvo, mediante la extracción con diferentes medios acuosos, tales como a) agua, b) Na₂EDTA y c) solución de HCl; mientras que la segunda fracción (F-II), se obtuvo mediante la extracción secuencial en medio alcalino del material residual.

Bajo las condiciones descritas en este estudio fue posible la extracción de polisacáridos del alga verde *Ulva clathrata*; el rendimiento obtenido, varió de 10.39 a

20.79% del peso seco del alga, estos rendimientos están dentro del rango de 8% a 29% en peso seco, reportado para diferentes especies de *Ulva* (Lahaye y Robic, 2007). Hubo diferencias en rendimiento y composición entre las diferentes condiciones de extracción probadas (Tabla IV.1).

Para todos los casos la F-I resultó con mayores rendimientos (7.72 a 14.83%) que la correspondiente extracción secuencial alcalina F-II (2.67 a 5.96%). Lo anterior coincide con el comportamiento obtenido por Percival (1964), quién en dos extracciones sucesivas reportó mayores rendimientos (22%) en una primer extracción (agua y clorito de sodio) que en las extracciones alcalinas sucesivas correspondientes (14.2%).

En nuestro estudio, los mayores rendimientos para F-I se obtuvieron con HCl (Tabla 1), esto, puede atribuirse a la mejor solubilidad en este medio de los polisacáridos ácidos y neutros. En forma similar la mayor eficiencia para la fracción F-II, correspondió a la extracción alcalina sucesiva de la extracción con HCl; esto puede explicarse en parte por la remoción de cationes que ocurre durante la extracción ácida previa; especialmente de metales divalentes como el calcio, los cuales interfieren en la solubilidad de los polisacáridos (Rinaudo, 2006). En congruencia con lo antes expresado, la extracción con el agente secuestrante de calcio, el Na_2EDTA , éste, tuvo también mayor eficiencia que el agua pura. En este sentido entonces, el uso de agentes quelantes de metales polivalentes ej. calcio (oxalato o EDTA), pueden ser auxiliares para la extracción de polisacáridos y mejorar su solubilidad posterior (Rinaudo, 2006; Robic, 2008).

Se ha reportado que la composición de los polisacáridos solubles de las especies de *Ulva*, es heterogénea y puede contener L-ramnosa, ácido D-glucurónico, D-xilosa y cantidades variables de grupos sulfato (Percival, 1964; Medcalf *et al.*, 1975; Lahaye *et al.*, 1999; Lahaye, 2001; Lahaye y Robic, 2007). Debido a esta heterogeneidad, es entendible que diferentes medios empleados en la extracción resulten en diferencias en la composición (Tabla IV.1); las cuales, pueden atribuirse a las propiedades de

solubilidad de los diferentes grupos de polisacáridos presentes (Lahaye, 2001; Rinaudo, 2006).

En la primer fracción F-I, se solubilizó el material más ácido, que corresponde a polisacáridos con un mayor contenido de sulfatos (27.87 a 35.8%) y baja cantidad de proteínas (0.39 a 0.56%); lo anterior, de acuerdo a Percival (1964), las proteínas presentes en los extractos de *Ulva*, pueden ser consideradas como material contaminante y no propiamente parte del polisacárido. En contraste la fracción alcalina (F-II), es menos iónica, posee menor contenido de sulfatos, pero fue mayor el contenido de proteínas (Tabla IV>1). La liberación de proteínas observada en esta última fracción, se explica por el rompimiento de puentes hidrógeno y posterior solubilización de este material en la solución alcalina (Robic *et al.*, 2008). En esta misma fracción se detectó un mayor contenido de ácidos urónicos, este hecho es probable que se deba a la mayor solubilidad de este componente en medio alcalino, tal como ocurre en alginatos (Haug, 1964).

En relación a los espectros de infrarrojo obtenidos para los polisacáridos de *U. clathrata* (Fig. IV.3 a, b), éstos, son similares a los mostrados para otras especies de *Ulva* (Ray y Lahaye, 1995; Castro *et al.*, 2006; Robic *et al.*, 2009a).

Se presenta un par de bandas asimétricas a 1650 y 1400 cm^{-1} , las cuales se relacionan a grupos carboxilo (C=O) probablemente de los ácidos urónicos (Colthup, 1950; Rao, 1967; Robic *et al.*, 2009a). En el caso del espectro que corresponde al extracto en HCl de F-I(Fig. 3a³), se observa una banda adicional a 1750 cm^{-1} , la cual puede relacionarse al grupo carboxílico protonado (Colthup, 1950). La presencia de una señal fuerte a 1260 cm^{-1} se debe a la vibración del enlace S=O, indica la presencia de los grupos éster sulfato (Lloyd *et al.*, 1961), dos señales pequeñas a 850 y 790 cm^{-1} son típicas para los ulvanos (Robic *et al.*, 2009a); donde la señal a 850 cm^{-1} se atribuye a la presencia de grupos éster sulfato en posición axial (Rochas *et al.*, 1986). La correspondencia de esta señal (850 cm^{-1}) con grupos sulfato, se comprueba con los espectros de IR para ulvano de *U. rigida* desulfatado-resulfatado donde ocurre la

desaparición-aparición de esta señal (Castro *et al.*, 2006). La señal a 790 cm^{-1} , se puede correlacionar a la presencia de azúcares cíclicos β . Se distinguen también señales fuertes alrededor de la región de 1055 cm^{-1} , estas, son debidas al estiramiento de la señal C-O de los enlaces hemiacetálicos de las unidades de ramnosa y ácido glucurónico, esta señal, ocurre en todos los ulvanos (Robic *et al.*, 2009a). En relación al IR para la fracción alcalina (F-II) (Fig IV3a), en todos los casos, presentan las mismas señales que la fracción F-I; sin embargo, hay una mejor definición de las señales, probablemente se deba al hecho de que en la primer fracción (F-I) ocurre una mezcla más compleja de polisacáridos, muchos de los cuales ya están ausentes en el extracto alcalino.

En relación a las señales obtenidas en el espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN^1), en campo alto se presenta la señal característica de los protones del grupo metilo (carbón primario) de la deoxi-manosa la α -L ramnosa; entre 3 y 4.5 ppm se encuentran las señales características de protones de los azúcares cíclicos, mientras que a campo bajo la señal a 5.3 ppm se relaciona al protón anomérico de la ramnosa sulfatada; en general, las señales encontradas en el espectro RMN^1 de *U. clathrata*, se correlaciona bien con los datos publicados para *Ulva spp.* (You *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 2006; Lahaye y Robic, 2007).

Como se mencionó con anterioridad, el método de extracción tiene influencia en la composición del polisacárido (Percival, 1964; Medcalf, 1975; Ray y Lahaye, 1995; Lahaye *et al.*, 1996; Robic *et al.*, 2009a). En nuestro estudio el principal polisacárido extraído de *U. clathrata*, corresponde a un polisacárido altamente sulfatado, más que aquellos reportados para *U. armoricana* (10.3 a 13.8%) y *U. rotundata* (9.2 a 12.5%) (Robic *et al.*, 2009a, c), pero es similar a la sulfatación obtenida para *U. conglobata* (23.04 a 35.2%) (Mao *et al.*, 2006). De manera similar a lo encontrado en este estudio, los polisacáridos de las especies antes mencionadas el azúcar ramnosa fué el residuo principal y en todas las especies el polisacárido contenía cantidades variables de ácidos urónicos y proteínas (Mao *et al.*, 2006; Robic, *et al.*, 2009 a, c).

En función de la estructura química idealizada propuesta por Lahaye (2001) para los ulvanes (Fig. IV.1), se obtiene la razón molar teórica de los componentes (Tabla 3). Relacionado a la estructura química idealizada para el ulván y considerando que los ácidos urónicos estuvieron presentes en todos los extractos, entonces nuestros resultados concuerdan bien con las estructuras idealizadas de los ácidos ulvanobiurónicos A_{3S} y B_{3S} (Fig. IV>4.1), ya que las ulvanobiosas se forman por xilosa y ramnosa; por lo tanto, en base a las razones molares de componentes, consideramos que las fracciones de polisacáridos obtenidas de *Ulva clathrata* en este estudio, corresponden a una estructura desviante de los ácidos ulvanobiurónicos (Tabla 2).

Con el propósito de establecer aplicaciones específicas de los ulvanos y correlacionar con sus propiedades bioactivas, es necesario realizar más trabajo para definir la estructura química de los polisacáridos presentes en las diferentes especies de *Ulva* y sus variaciones.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo, se analizan especies de macroalgas pardas y verdes abundantes en las costas de Baja California y se aportan datos acerca de sus polisacáridos sulfatados.

Los polisacáridos sulfatados, se distribuyen en todas las divisiones algales; en particular los presentes en algas rojas como agar y carragenanos, son sistemas de polisacáridos ampliamente estudiados; sin embargo aquellos que se encuentran en algas pardas y verdes, es aún necesario, definir con certeza sus propiedades acordes a su composición química.

Debido a que el sistema de polisacáridos en algas marinas es muy complejo, la temperatura y el medio de extracción influyen en el rendimiento y composición de los polisacáridos sulfatados. La temperatura, influye positivamente en el rendimiento, sin embargo presenta una correlación negativa con la selectividad.

El medio de extracción afectó el rendimiento y composición de los polisacáridos sulfatados de algas pardas, la extracción con sales de calcio produjo polisacáridos con mayor contenido de sulfatos, probando ser un medio más selectivo; sin embargo, el medio ácido, produjo los mejores rendimientos con mejores características de solubilidad.

En las dos divisiones de macroalgas estudiadas, los polisacáridos solubles obtenidos corresponden a polisacáridos sulfatados no galactanos, donde, para algas pardas fucosa, es el azúcar principal y ramnosa en las algas verdes Ulvales.

Mientras que en ambos casos se ocurren cantidades equivalentes de ácidos urónicos; las algas verdes presentan un mayor grado de sulfatación.

Los polisacáridos solubles de algas pardas y algas verdes, son entidades heterogéneas, donde además de su azúcar constituyente (fucosa y ramnosa respectivamente), poseen en su composición, cantidades variables de grupos hemiéster sulfato y ácidos urónicos, entre otros azúcares, de ahí que en función de su

carga iónica y o diferentes pesos moleculares, presenten diferencias que pueden ser aprovechadas para separar las moléculas de polisacáridos presentes, por diferentes métodos químicos y cromatográficos, tal como quedó demostrado en este estudio.

La biosíntesis de polisacáridos sulfatados, es afectada por los parámetros ambientales, ya que estos afectan el metabolismo algal; en particular se observó que el grado de sulfatación muestra una relación inversa con la temperatura, esto contrasta con lo que ocurre en los PS de algas rojas, donde el contenido de sulfatos se incrementa con la temperatura.

A pesar de que las condiciones de cultivo, a que se sometió el alga parda *S. compressa*, no controlaron todas las variables, los resultados son congruentes con el patrón biosintético de sulfatación propuesto, que menciona que primero ocurre la biosíntesis del polisacárido y la incorporación del sulfato es un evento posterior, en este estudio el tejido joven presentó un menor nivel de sulfatación.

RECOMENDACIONES

Muchas de la bioactividad que se le atribuye a los polisacáridos sulfatados (fucoidán y ulván), generalmente, se basan en la aplicación de extractos crudos; la separación de entidades de composición definida es una mejor alternativa en la búsqueda de los principios activos.

Aunque gran parte de la bioactividad, que presentan éste tipo de compuestos, generalmente se asocia a la cantidad de grupos sulfato presentes; es necesario estudiar y caracterizar los polisacáridos presentes en las macroalgas de la región; ya que dentro de la gama de productos podría haber cierta especificidad como antivirales, anticancerígenos etc.

Un punto interesante sería, elucidar la estructura y composición de los extractos obtenidos mediante degradación enzimática y separaciones cromatográficas.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Aguilar-Rosas R, Aguilar-Rosas LE, Mateo-Cid LE, Mendoza-González AC y Krauss-Cosío H. 2002. *Hesperophycus* y *Silvetia* representantes de la familia Fucaceae (Fucales, Phaeophyta) en la costa del Pacífico de México. *Hidrobiológica* 12(2): 147-156.
- Abdel-Fattah AF, Edrees M. 1973. Seasonal changes in the constituents of *Ulva lactuca*. *Phytochemistry* 12: 481–485.
- Alves AP, Mulloy B, Diniz JA and Mourao PAS. 1997. Sulfated polysaccharides from the egg jelly layer are species-specific inducers of acrosomal reaction in sperms of sea urchins. *J Biol Chem* 272: 6965±6971.
- Aquino RS, Landeira-Fernandez AM, Valente A-P, Andrade LR, Mourão PAS. 2005. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: Evolutionary implications. *Glycobiology*. 15:11–20.
- Barker SA, Bourne EJ, Stacey M, Whiflen DH. 1954. Infrared spectra of carbohydrates. Part 1. Some derivatives of D-glycopyranose. *Journal of the Chemical Society*, 171-176.
- Berteau, O, Mulloy B. 2003. Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharides. *Glycobiology* 13:29R–40R.
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. 2002. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate research* 337(8):719-730.
- Bitter T, Muir HM. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem* 4: 330-334.
- Bisgrove SR and Kropf DL. 2001. Cell wall deposition during morphogenesis in fucoid algae. *Planta* 212: 648-658.
- Black WAP. 1954. The seasonal variation in the combined L-fucose content of the common British Laminariaceae and Fucaceae. *J Sci Food Agr* 5: 445±448.

- Black WAP, Dewar ET, Woodward FN. 1952. Manufacture of algal chemicals. IV - Laboratory-scale isolation of fucoidin from brown marine algae. *J Sci Food Agric*: 3: 122–129.
- Blunden G, Barwell CJ, Fidgeon KJ & Jewers K. 1981. A survey of some British marine algae for anti-influenza virus activity. *Bot mar* 24: 267-272.
- Bociek SM, Welti D. 1975. The quantitative analysis of uronic acid polymers by infrared spectroscopy. *Carbohydr Res* 42:217–226.
- Borowitzka MA. 1972. Intertidal algal species diversity and the effects of pollution. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 25: 73-84.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–255.
- Castro R, Piazzon MC, Zarra I, Leiro J, Noya M, Lamas J. 2006. Stimulation of turbot phagocytes by *Ulva rigida* C. Agardh polysaccharides. *Aquaculture* 254: 9-20.
- Cássaro CMF and Dietrich CP. 1977 Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. *J Biol Chem* 252: 2254–2261.
- Casu B, Scovenna G, Cifonelli AJ, Perlin AS. 1978. Infrared spectra of glycosaminoglycans in deuterium oxide and deuterium chloride solution: quantitative evaluation of uronic acid and acetamidodeoxyhexose moieties. *Carbohydr Res* 63:13–27
- Chang-Hu X, Yu-Fang, Hong-Lin, Lei-Chen, Zhao-Jie L, Deng-Deng, Chong-Xiao L. 2001. Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*, *Journal of Applied Phycology* Vol. 13 No. 1
- Chapman VJ and Chapman DJ. 1980. *Seaweeds and their Uses*. Chapman and Hall, 334 pp.
- Chevolot L, Foucault A, Kervarec N, Siquin C, Fisher AM and Boisson-Vidal C. 1999. Further data on the structure of brown seaweed fucans: relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr Res* 319: 154±165.

- Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, and Usov AI. 1999. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* 320: 108±119.
- Ciancia M, Quintana I, Vizcarguenaga MI, Kasulin L, Dios A, Estevez JM, Cerezo AS. 2007. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis. *Int J Biol Macromol* 41: 641–649.
- Collic S, Boisson-Vidal C, Jozefonvicz J. 1994. A low molecular weight fucoidan from the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Phytochemistry* 35: 697–700.
- Colthup NB. 1950. Spectra-Structure Correlations in the Infra-Red Region. *J Opt Soc Amer* 40 (6): 397- 400.
- Craigie JS, Wen ZC. 1984. Effects of temperature and tissue age on gel strength and composition of agar from *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae) *Can J Bot* 62: 665-1670.
- Craigie J. 1990. Cell wall. In: Cole KM, Sheath RG (eds), *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press: 227-257.
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Guajardo-Barbosa C, Ricque-Marie D. 2009. Comparison of *Ulva clathrata* and the kelps *Macrocystis pyrifera* and *Ascophyllum nodosum* as ingredients in shrimp feeds. *Aqua Nutr* 15: 421-430.
- Darcy-Vrillon B. 1993. Nutritional aspects of the developing use of macroalgae for human food industry. *Int J Food Sci Nutr* 44: 523-535.
- Davison IR, Pearson GA. 1996. Environmental stress in intertidal seaweeds. *J. Phycol.* 32(2): 197-211.
- Davison IR, Reed RH. 1985. The physiological significance of mannitol accumulation in brown algae: the role of mannitol as a compatible cytoplasmic solute. *Phycologia* 24:449–457.
- Dawes, C. 1986. *Botánica Marina*. Limusa, México, 673 pp.
- Dische Z. 1962a. Color reactions of 6-deoxy-, 3-deoxy- and 3,6-dideoxyhexoses. In: Whistler RL, Wolfrom ML (eds) *Methods of carbohydrate chemistry*, vol 1. Academic Press London: 501–503
- Dische, Z. 1963. New color reactions for determination of sugars in polysaccharides. *Meth Biochem Anal* II: 313-358

- Domozych DS, Stewart KD and Mattox KR. 1980. The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (Chlorophyta). *J Mol Evol* 15: 1–12
- Dubois M, Gibs KA, Hamilton JK, Rebers DA, Smith F. 1956. Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350–352.
- Durazo R y Baumgartner TR. 2002. Evolution of oceanographic conditions off Baja California: 1997-1999. *Progress Oceanography* 54:7-31.
- Farias EH, Pomin VH, Valente, AP, Nader HB, Rocha HA, Mourao, PA. 2008. A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*. *Glycobiology* 18: 250–259.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT and Falkowski P. 1998. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 10 July. Vol 281 No 5374: 237-240.
- Ghosh T, Chattopadhyay K, Marschall M, Karmakar P, Mandal P & Ray B. 2009. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure–activity analysis to clinical evaluation. *Glycobiology* Vol 19 No 1: 2–15.
- Gu-Ping Hu, Jie Yuan, Li Sun, Zhi-Gang She, Jue-Heng Wu, Xiu-Jian Lan, Xun Zhu, Yong-Cheng Lin, Sheng-Ping Chen. 2011. Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine drugs*. 01/2011; 9(4):514-25.
- Haug A. 1964. In: Report No. 30, Norwegian Institute of Seaweed Research Trondheim, Norway. 2. A. Linker and RS Jones. *Nature* 204 187 pp.
- Haug A and Larsen B. 1974. Biosynthesis of Algal Polysaccharides IN *Plant Carbohydrate Biochemistry*. editor J.B. Pridham. Academic Press New York NY: 207-208.
- Hernández-Garibay E, Guardado-Puentes J, Bautista-Alcantar J y Reyes-Tisnado R. 2006. Pesquería de Macroalgas del Océano Pacífico. En: *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo*. Instituto Nacional de Pesca. SAGARPA. México.
- Hogsett WE, and RS Quatrano. 1975. Isolation of polysaccharides sulfated during early embryogenesis in *Fucus*. *Plant Physiol* 55: 25-29.

- Indergaard M and Minsaas J. 1991. Animal and human nutrition. In: Guiry MD & Blunden G (Ed.) Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential. John Wiley & Sons New York: 21-64.
- Iriki Y and T Miwa. 1960. Chemical nature of the cell wall of the green algae, *Codium*, *Acetabularia* and *Halicoryne*. Nature Lond 185: 178.
- Iwamoto K, Shiraiwa Y. 2005. Salt-Regulated Mannitol Metabolism in Algae. Minireview en: Marine Biotechnology. Online publication: 8 August 2005. Consultado en línea, 5 de junio, 2011.
- Kloareg B. 1984. Isolation and analysis of cell walls of the brown marine algae *Pelvetia canaliculata* and *Ascophyllum nodosum*. Physiol Veg 22: 47±56.
- Kloareg B, Demarty M and Mabeau S. 1986. Polyanionic characteristic of purified sulfated homofucans from brown algae. Int J Biol Macromol 8: 380±386.
- Kloareg B and Quatrano RS. 1988. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matriz polysaccharides. Oceanogr Mar Biol Annu Rev 26: 259±315.
- Lahaye M. 1991. Marine algae as sources of fibres: determination of soluble and insoluble dietary fibre content in some 'sea vegetables'. J Sci Food Agric 54: 587-594.
- Lahaye M. 2001. Chemistry and physico-chemistry of phycocolloids. Cah Biol Mar 42: 137–157.
- Lahaye M, Alvarez-Cabal CE, Kuhlenkamp R, Quemener B, Lognone´ V& Dion, P. 1999. Chemical composition and ¹³C NMR spectroscopic characterization of ulvans from *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta). J Appl Phycol 11: 1–7.
- Lahaye M, Brunel M, Bonnin E. 1997. Fine chemical structure analysis of oligosaccharides produced by an ulvan-lyase degradation of the water-soluble cell-wall polysaccharides from *Ulva* sp. (Ulvales, Chlorophyta). Carbohydr Res 304: 325–333.
- Lahaye M & Ray B. 1996. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta)-NMR analysis of ulvan oligosaccharides. Carbohydr Res 283: 161–173.

- Lahaye M & Robic A. 2007. Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 8: 1765–1774.
- Larsen B. 1967. Sulfated polysaccharides in brown algae. II. Isolation of 3-O-b-D-xylopyranosyl-L-fucose from *Ascophyllum*. *Acta Chem Scand* 21: 1395-1396.
- Larsen B 1978. Fucoidan. En *Handbook of Phycological Methods: Physiol. and Biochem. Methods*. Edited by Hellebust JA and Craigie JS, Cambridge University Press: 152-156.
- Larsen B, Haug A, and Painter TJ. 1966. Sulfated polysaccharides in brown algae. Isolation and preliminary characterisation of three sulfated polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* (L.) Le JOL *Acta Chem Scand* 20: 219±230.
- Larsen B, A Haug and T Painter. 1970. Sulfated polysaccharides in brown algae. III. The native state of fucoidan in *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Acta Chem Scand* 24: 3339-3352.
- Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, and Hayashi T. 2004a. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52: 1091-1094.
- Li B, Lu F, Wei X & Zhao R. 2008. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* 13 (8): 1671-1695.
- Lloyd AG, Dodgson KS, Price RG & Rose FAI. 1961. Infrared studies on sulphate esters. I. Polysaccharide sulphates. *Biochim Biophys Acta* 46: 108–115.
- Lobban CS & PJ Harrison. 1994. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 366 pp. Schramm, Winfrid and Pieter H. Nienhuis (eds).
- Mabeau S & Fleurance J. 1993. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology* 4: 103-107.
- Mabeau S and Kloareg B. 1997. Isolation and analysis of the cell walls of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranoides*, *F. vesiculosus*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digitata*. *J Exp Bot* 38: 1573–1580.
- Mabeau S., Kloareg B and Joseleau JP. 1990 Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry* 29: 2441±2445.

- Maeda M, Uehara T, Harada N, Sekiguchi M, Hiraoka A. 1991. Heparinoid-active sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their distribution in the *Chlorophyta*. *Phytochem* 30: 3611–3614.
- Mackie IM, Percival E. 1959. The constitution of xylan from the green seaweed *Caulerpa filiformis*. *J Chem Soc* 1151–1156.
- Mao W, Zang X, Li Y & Zhang H. 2006. Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *J Appl Phycol* 18: 9-14.
- McCandless EL. 1981. Polysaccharides of the seaweeds. En: *The Biology of Seaweeds*. Lobban CS & M J Wynne, (Eds). University of California Press. Berkeley and Los Angeles, 786 pp.
- McCandless EL & Craigie JS. 1979. Sulfated polysaccharides in red and brown algae. *Annu Rev Plant Physiol* 30: 41-53.
- McCully ME. 1968. Histological studies on the genus *Fucus*. II. Histology of the reproductive tissues. *Protoplasma* **66**, 205-230.
- McLellan DS & Jurd KM. 1992. Isolation of guanosine diphosphate uronic acids from a marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *Blood Coagul Fibrinolysis*. Feb 3(1): 69-77.
- Medcalf DG, Root CF, Craney CL, Mukhopadhyay D, Miller CK, Hopewell WD. 1972. Chemical Characterization of Mucilaginous Polysaccharides from Ulvaceae Species Native to the Puget Sound. In: *Proceeding of the Seventh Int Seaweed Symp* NISIZAWA K (ed.) Univ Tokyo Press Tokyo: 541-547.
- Medcalf DG, Lionel T, Brannon JH and Scott JR. 1975. Seasonal variation in the mucilaginous polysaccharides from *Ulva lactuca*. *Bot Mar* 18: 67–70.
- Medcalf DG, Schneider TL and Barnett RW. 1978 Structural features of a novel glucuronogalactofucan from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr Res*, 66: 167±171.
- Mesa-Soria R. 2008. Efecto de la temperatura en la composición del alga verde *ulva clathrata* en condiciones de cultivo. Tesis de Licenciatura Facultad de Ciencias Marinas, UABC Ensenada B.C., México.
- Mian AJ & Percival E. 1973. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, and *Padina pavonia*. *Carbohydr Res* 26: 133±146.

- Mondragon J & Mondragon J. 2003. Seaweeds of the Pacific Coast. Sea Challengers Publications, Monterey, California. ISBN 0-930118-29-4. Consultado en línea Noviembre 2010.
- Mourão PAS. 2004. Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Curr. Pharmaceut. Des.* 10, 967-981.
- Mourao PA. 2007. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. *Braz J Med Biol Res.* 40:5–17.
- Murillo-Álvarez JI, Muñoz-Ochoa M, Rodríguez-Montesinos YE, Arvizu-Higuera DL y Hernández-Carmona G. 2006. Las algas marinas del estado de Baja California Sur como fuente de polisacáridos sulfatados con actividad anticoagulante. V Encuentro Nacional de Biotecnología del Instituto Politécnico Nacional. Nov 28 a Dic 1, 2006 México.
- Muñoz-Ochoa M. 2006. Extracción y caracterización de polisacáridos con actividad anticoagulante a partir de algas colectadas en Baja California Sur, México. Tesis de Maestría. CICIMAR, IPN, La Paz BC México.
- Nagaoka M, Shibata H, Kimura-Takagi I, Hashimoto S, Aiyama R, Ueyama S & Yokokura T. 2000. Anti-ulcer effects and biological activities of polysaccharides from marine algae. *Biofactors* 12: 267-274.
- Nisizawa K, Noda H, Kikuchi R, Watanabe T. 1987. The main seaweed foods in Japan. *Hydrobiologia* 151/152: 5-29.
- Nishino T, Kiyohara H, Yamada H & Nagumo T. 1991. An anticoagulant fucoidan from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Phytochemistry* 30: 535–539.
- Painter TJ. 1983. Algal polysaccharides. En: Aspinall GO, editor. *The Polysaccharides*. 1st ed. Vol. 2. New York Academic Press: 195-285.
- Parker BC. 1970. Significance of cell wall chemistry to phylogeny in the algae. *Ann NY Acad Sci* 175: 417–427.
- Pesando D & B Caram. 1984. Screening of marine algae from the French Mediterranean coast for antibacterial and antifungal activity. *Bot mar* 28: 381-386.

- Patankar MS, Oehninger S, Barnett T, Williams RL, & Clark GF. 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem* 268: 21770±21776.
- Percival E. 1964. Polysaccharides of the green seaweeds *Ulva lactuca* and *Enteromorpha compressa*. *Proc Int Seaweed Symp* 4: 360–365.
- Percival E. 1968. Glucuronoxylfucan, a cell-wall component of *Ascophyllum nodosum*. *Carbohyd Res* 7: 272±283.
- Percival E. 1979. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. *Br phycol J* 14:103-117.
- Percival EGV and Ross AG. 1950. The isolation and purification of fucoidin from brown seaweeds. *J Chem Soc*: 717±720.
- Percival E, & Wold, J K. 1963. The acid polysaccharide from the green seaweed, *Ulva lactuca*. II. The site of ester sulphate. *J. chem. Soc.* 5459-5468.
- Percival E, McDowell RH. 1967. *Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides*. Academic Press, New York NY USA; p. 219.
- Pereira MS, Mulloy B & Mourao, PA. 1999. Structure and anticoagulant activity of sulfated fucans: Comparison between the regular repetitive and linear fucans from echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae. *J Biol Chem* 274: 7656–7667.
- Pomin VH & PAS Mourao. 2008. Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans. *Glycobiology* Vol. 18 No. 12: 1016–1027.
- Pomin VH. 2010. Structural and functional insights into sulfated galactans: A systematic review. *Glycoconj J* 27:1–12.
- Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML & Stortz CA. 2003. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohyd Res* 338: 153–165.
- Popper ZA and Tuohy MG. 2010. Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell walls. *Plant Physiol* 153: 373–383.
- Quatrano RS & Stevens PT. 1976. Cell wall assembly in *Fucus* zygotes. I. Characterization of the polysaccharide components. *Plant Physiol* 58: 224-231.

- Ragan MA. 1984. Bioactivities in marine genera of Atlantic Canada: The unexplored potential. Proc N S Inst Sci 34: 83-112.
- Rao CNR. 1967. Chemical Applications of Infrared Spectroscopy. Academic Press, New York: 260-262.
- Ray B & Lahaye M. 1995. Cell-wall polysaccharides from the marine green alga *Ulva rigida* (Ulvales, Chlorophyta). Chemical structure of ulvan. Carbohydr Res 274: 313-18.
- Resendiz-Aguilar G, Hernández-Carmona G, Muñoz-Ochoa M, Murillo-Álvarez J I & Hernández-Garibay E. 2010. Extraction, partial characterization and Anticoagulant activity of fucoidan from four species of brown seaweed. XX International Seaweed Symposium. Ensenada, Baja California, México. 22 - 26 de Febrero, 2010.
- Rochas C, Lahaye M and Yaphe W. 1986. Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. Botanica Marina 9: 335-340.
- Ruperez P, Ahrazem O & Leal JA. 2002. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. J Agric Food Chem 50: 840–845.
- Rinaudo M. 2006. Polysaccharides. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol. 20, 5e éd, J Wiley & Sons, New York: 549-586.
- Robic A. 2008. Etude de la variabilité chimique, physico-chimique et rhéologique des ulvanes, polysaccharides des parois cellulaires d'algues marines vertes de la famille des *Ulves* (Ulvales, Chlorophyta). PhD Thesis, Nantes University, Nantes, France.
- Robic A, Sassi JF & Lahaye M. 2008. Impact of stabilization treatment of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physic-chemical and rheological properties of ulvan. Carbohydrate Polymers 74: 344-352.
- Robic A, Bertrand D, Sassi JF, Lerat Y & Lahaye M. 2009a. Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FT-IR and chemometrics. J Appl Phycol 21: 451–456.
- Robic A, Bertrand D, Sassi JF, Lerat Y & Lahaye M. 2009b. Ultrastructure of ulvan: A polysaccharide from green seaweeds. Biopolymers 91(8): 652-664.

- Robic A, Sassi JF, Dion P, Lerat Y & Lahaye M. 2009c. Seasonal variability of physico-chemical and rheological properties of ulvan from two *Ulva* species (Chlorophyta) of Brittany Coast J Phycol 45: 962-973.
- Schweiger RG. 1962. Methanolysis of fucoidan. I. Preparation of methyl α -L-fucoside and L-fucose. J Org Chem, 27: 4267-4272.
- Shanmugan M & KH Mody. 2000. *Heparinoid-active sulfated polysaccharides from marine algae as potential blood anticoagulant agents*. Current Science 79/12/2000 S. 1672-83. <http://www.ias.ac.in/currsci/dec252000/1672.pdf>. Consultado en línea 14 de nov, 2010.
- Silva TMA, Alves LG, Queiroz KCS, Rocha HAO & Leite EL. 2005. Partial characterization and anticoagulant activity of a heterofucan from the brown seaweed *Padina gymnospora*. Braz J Med Biol Res 38: 523-533.
- Smidsrod O. 1973. Some physical properties of alginates in solution and in the gel state. Report N. 34. Norwegian Institute of Seaweed Research, Trondheim, Norway.
- Smidsrød O & Grasdalen H. 1984. Polyelectrolytes from seaweeds. Hydrobiologia 116/117: 19-28.
- Smidsrød O & Haug A. 1967. Precipitation of acidic polysaccharides by salts in ethanol - water mixtures. J Polym Sci 16: 1587-1598.
- Smit AJ. 2004. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. Journal of Applied Phycology 16: 245-262.
- Tabatabai MA. 1974. Determination of sulfate in water samples. J Sulphur Inst 10: 11-13.
- Tako M, Nakada T and Hongou F. 1999. Chemical Characterization of from Commercially Cultured *Nemacystis decipiens*. Biosc Biotechnol Biochem 63(10):1813-1815.
- Tako M, Yoza E, Tohma S. 2000. Chemical Characterization of Acetyl Fucoidan and Alginate from Commercially Cultured *Cladosiphon okamuranus*. Botanica Marina Volume 43, Issue 4: 393-398.
- Teichberg M, Fox MT, Olsen YO, Valiela I, Martinetto P, Iribarne O, Muto EY, Petti MAV, Corbisier TN, Soto-Jiménez M, Páez-Osuna F, Castro P, Freitas H, Zitelli A, Cardinaletti M & Tagliapietra D. 2010. Eutrophication and macroalgal blooms in

- temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global Change Biology* 16(9): 2624–2637.
- Toida T, Chairedgumjorn A, & Linhardt R J. 2003. Structure and bioactivity of sulfated polysaccharides. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 15, 29–46.
- Ushakova N A, Morozevich NE, Bilan MI, Usov AI, Nifantiev NE and Preobrazhenskaya ME 2009. Anticoagulant Activity of Fucoidans From Brown Algae. *Experimental Studies. Biochemistry (moscow) Supplement Series b: Biomedical Chemistry Vol 3, No 1*.
- Yoon SJ, Pereira MS, Pavão MSG, Hwang JK, Pyun YR, and Mourão PAS. 2002. The medicinal plant *Porona volubilis* contains polysaccharides with anticoagulant activity mediated by heparin cofactor II. *Thromb Res* 106: 51–58.
- You L, Liu Q, Shi, Y, Wang CX, Lahaye M & Tran V. 1997. The conformational study of b-D-GlcA-(1, 4)-L-Rha in solution by NMR and molecular dynamics simulations. *Chemical Physics* 224: 81-94.
- Zar JH. 1999. *Biostatistical analysis*. 4th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Zertuche-González J. 1993. Situación actual de la industria de las macroalgas productoras de ficocoloides en America Latina y el Caribe. *FAO Documento de campo No. 13, México* pp. 5-15.

ANEXOS