

Cuantificación y caracterización de fucoidanos de distintas algas pardas del Golfo Nuevo, Chubut, Argentina

Quantification and characterization of fucoidans from different brown algae from Nuevo Gulf, Chubut, Argentina

Presentación: 4 y 5 de Octubre 2022

Doctorando:

Ezequiel Latour

Grupo de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Acuicultura y Pesca (GIDTAP), Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Chubut – Argentina.
elatour@frch.utn.edu.ar

Director:

Fernando Gaspar Dellatorre

Codirector:

Nora Marta Andrea Ponce

Resumen

Los fucoidanos de muchas especies de algas han sido investigados debido a su actividad biológica. Aunque la relación entre estas bioactividades y la estructura de los fucoidanos aún no se ha dilucidado, se ha demostrado que la composición de los monosacáridos, el contenido y distribución de los ésteres de sulfato y el peso molecular juegan un papel fundamental. El objetivo de este trabajo es realizar una evaluación de cuatro especies de algas pardas de las costas del Golfo Nuevo, como fuentes de fucoidanos. Para ello, tejidos secos de *Myriogloea major*, *Eudesme virescens*, *Colpomenia sinuosa* y *Asperococcus ensiformis* fueron sometidas al mismo protocolo de extracción. Se compararon rendimientos, composición de monosacáridos, contenido de azúcares, sulfatos, ácidos urónicos y proteínas. Los resultados sugieren que *M. major* puede ser una fuente de fucoidanos, se escogió uno de sus extractos para realizar su fraccionamiento y, en el futuro, avanzar con su elucidación estructural.

Palabras clave: Fucoidanos, macroalgas, sulfatos, polisacáridos, nutraceuticos, biotecnología

Abstract

Fucoidans of many species have been investigated due to their biological activity. Although the relationship between these bioactivities and the structure of fucoidans has not yet been elucidated, it has been proven that the composition of monosaccharides, the content and distribution of sulfate esters, and the molecular weight play a fundamental role. The objective of this work is to make an initial evaluation of four species of brown algae from the coasts of the Nuevo Gulf, as possible sources of fucoidans. For this, dry tissues of *Myriogloea major*, *Eudesme virescens*, *Colpomenia sinuosa* and *Asperococcus ensiformis* were subjected to the same extraction protocol. Yields, monosaccharide composition, sugar content, sulfates, uronic acids, and proteins were compared. The results suggest that *M. major* can be a source of fucoidans, one of its extracts was chosen to carry out its fractionation and, in the future, to advance with its structural elucidation.

Keywords: Fucoidans, macroalgae, sulfate, polysaccharides, nutraceutical, biotechnology

Introducción

La pared celular de las algas está formada por dos componentes: uno fibrilar que forma el esqueleto y otro amorfo que forma la matriz en la cual se embebe el componente fibrilar. En las macroalgas pardas, el componente fibrilar o estructural de la pared celular es celulosa, mientras que el componente amorfo contiene ácido algínico y polisacáridos sulfatados ricos en fucosa, denominados fucoidanos (Lee, 2018: 415). Los fucoidanos son un diverso y complejo grupo de polisacáridos compuestos por grupos L-fucosa y sulfato, aunque también se han encontrado otros monosacáridos como galactosa, xilosa, ramnosa, manosa y ácido glucurónico (Ponce & Stortz, 2020: 4 - 18). Poseen una intensa actividad biológica que está relacionada con su estructura y composición de monosacáridos, el contenido y distribución de ésteres sulfato y su peso molecular (Fitton et al, 2015: 5922 - 5923). Esta actividad incluye funciones anticancerígenas, inmunomodulatorias, antipatogénicas, antiinflamatorias, antitrombóticas, anticoagulantes y antioxidantes. Además estudios les adjudican efectos contra desórdenes renales y hepáticos (Fitton, 2015: 5928 - 5936), así como en enfermedades oftalmológicas (Klettner, 2016: 7).

La intensa actividad biológica que se le atribuye a estos polisacáridos proporciona perspectivas muy prometedoras en una amplia gama de aplicaciones, particularmente en el campo biomédico y para la industria farmacéutica. La limitación principal para uso clínico radica en las variaciones de su estructura y composición química, que dan como resultado variaciones en la bioactividad de los fucoidanos. Estas variaciones se relacionan principalmente con la especie, la época y lugar de cosecha y los métodos de extracción (Liu, 2021: 6 - 7).

El litoral marítimo argentino cuenta con una gran diversidad de macroalgas nativas (Boraso de Zaixso, 2013). Particularmente la región más fría es rica en especies de macroalgas pardas con uso potencial para la extracción de fucoidanos. Una pregunta básica es qué especies de algas son las más adecuadas como fuentes de fucoidanos bioactivos para futuras investigaciones que incluyan fraccionamiento de los polisacáridos, elucidación estructural y estudios de actividad biológica. En este contexto, se compararon los rendimientos y la composición química de fucoidanos extraídos de cuatro especies de algas pardas, cosechadas en la costa sur del Golfo Nuevo, Chubut, Argentina. Las especies estudiadas son *Myriogloea major* (Asensi, 1973), *Asperococcus ensiformis* (Wynne, 2003), *Eudesme virescens* (Agardh, 1882) y *Colpomenia sinuosa* (Castagne, 1851). Todas las muestras fueron sometidas al mismo método de extracción. La caracterización de los extractos se realizó determinando el grado de sulfatación, el contenido de azúcares neutros, ácidos urónicos, proteínas y la proporción de los distintos azúcares neutros.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se procedió con el fraccionamiento de un extracto de *Myriogloea major*, posteriormente se realizarán los estudios de elucidación estructural. Esta especie endémica de Argentina es similar a otros miembros de la familia Chordariaceae utilizadas como fuente comercial de fucoidanos. Esta alga es un recurso que actualmente no está en absoluto explotado y los fucoidanos obtenidos de ella no han sido estudiados hasta ahora. En el presente trabajo se presentan los avances realizados hasta la fecha.

Desarrollo

Materiales y métodos

El muestreo se realizó en la costa sur del Golfo Nuevo, provincia de Chubut. Las especies *C. sinuosa*, *A. ensiformis* y *M. major* se realizó en forma manual en el intermareal inferior. *C. sinuosa* se muestreó en mayo y principios de septiembre del 2019. *Myriogloea* se recolectó a fines del año 2018 y principios del 2019. *E. virescens* se muestreó durante el verano del año 2020 ambas en forma manual mediante buceo autónomo. La primera muestra de *A. ensiformis* se recolectó en septiembre del 2019 y una muestra fue recolectada durante el invierno del 2021 (esta por buceo autónomo). Las muestras fueron trasladadas al laboratorio, cuidadosamente liberadas de epibiontes y especies acompañantes, lavadas con agua de mar y brevemente con agua destilada y secadas bajo techo a temperatura ambiente y finalmente molidas y tamizadas entre 125 y 500 μm y almacenadas en un ambiente seco.

La determinación de azúcares totales se realizó mediante el método colorimétrico del fenol-ácido sulfúrico. La cuantificación de ácidos urónicos totales se efectuó mediante el método descrito por Filisetti-Cozzi y Carpita (1991) utilizando glucuronolactona como estándar. La determinación de proteínas se realizó siguiendo la técnica descrita por Lowry y colaboradores (1951). La determinación del contenido de grupos sulfato en los extractos se efectuó mediante un método turbidimétrico (Dodgson & Price, 1962). El análisis de la composición de azúcares neutros de

los extractos obtenidos se realizará mediante cromatografía gaseosa. Los extractos se someterán a hidrólisis ácida y derivatización de los azúcares a los alditoles peracetilados correspondientes.

El método utilizado es el fraccionamiento con bromuro de hexametilamonio (cetrimide). Consiste en precipitación de los extractos con sales de cetrimide seguida de redisolución con cloruro de sodio.

Resultados

Los resultados de rendimientos de los extractos (% de peso seco), contenido de esteres sulfatos (%SO₃Na), determinación de azúcares neutros (% azúcar anhidro), el porcentaje de ácidos urónicos y el contenido de proteínas (%) se muestran en la tabla 1. (Falta determinar el contenido de sulfatos en los extractos de *A. ensiformis* de agosto del 2021 y el porcentaje de proteínas de los extractos calientes).

Muestra	Rendimiento (% peso seco)	Sulfatos (% SO ₃ Na)	Azúcares (% anh)	(%) Ác. Urónicos	(%) Proteínas
M.D (EF)	19,8 ± 0,4	20,8 ± 2,3	58,5 ± 2,5	9,5 ± 1,6	3,7 ± 0,1
M.E (EF)	24,6 ± 0,6	19,1 ± 1,6	58,6 ± 2,3	13,1 ± 1,9	2,6 ± 0,1
M.D (EC)	18,6 ± 0,3	18,0 ± 1,4	51,0 ± 1,7	13,2 ± 0,9	-
M.E (EC)	17,4 ± 0,4	14,7 ± 1,1	50,3 ± 1,2	13,4 ± 1,2	-
E.E (EF)	9,5 ± 0,3	17,1 ± 1,1	48,2 ± 1,3	12,2 ± 1,2	3,1 ± 0,4
E.F (EF)	5,6 ± 0,1	16,2 ± 1,6	48,9 ± 1,0	13,2 ± 1,7	2,2 ± 0,2
E.E (EC)	5,8 ± 0,5	12,2 ± 2,3	52,5 ± 2,4	22,8 ± 2,6	-
E.F (EC)	6,9 ± 0,2	11,5 ± 1,9	59,8 ± 2,2	28,8 ± 2,4	-
C.M (EF)	1,4 ± 0,2	14,4 ± 1,0	49,4 ± 2,7	8,7 ± 0,9	25,1 ± 2,5
C.S (EF)	1,5 ± 0,2	14,6 ± 2,6	47,3 ± 2,4	8,5 ± 2,4	21,7 ± 3,8
C.M (EC)	6,4 ± 2,2	7,1 ± 1,9	60,3 ± 2,5	33,3 ± 4,0	-
C.S (EC)	6,3 ± 0,6	5,8 ± 1,0	59,4 ± 1,8	37,4 ± 2,0	-
A.A (EF)	2,9 ± 0,4	-	64,1 ± 2,4	8,2 ± 0,7	10,6 ± 0,3
A.S (EF)	7,4 ± 0,9	19,9 ± 1,4	62,4 ± 1,6	4,7 ± 0,6	6,7 ± 1,0
A.A (EC)	13,8 ± 2,8	-	56,2 ± 2,3	25,2 ± 2,7	-
A.S (EC)	18,5 ± 0,7	11,3 ± 1,0	57,6 ± 1,5	25,3 ± 2,8	-

Tabla 1: Rendimiento de fucoidanos (% de peso seco), contenido de sulfatos (%SO₃Na); azúcares neutros (% azúcar anhidro); ácidos urónicos (%) y proteínas totales (%) en los extractos de *M. major* cosechadas en diciembre del 2018 (M.D) y enero 2019 (M.E), *E. virescens* recolectadas en enero (E.E) y en febrero (E.F) del 2020, *C. sinuosa* recogidas en mayo (C.M) y septiembre del 2019 (C.S) y *A. ensiformis* cosechadas en septiembre del 2019 (A.A) y en agosto del 2021 (A.S), para extractos fríos (EF) y calientes (EC). (± SD, n=3, “-“ muestra no analizada)

Hasta el momento se determinó la composición de monosacáridos de dos extractos fríos, correspondientes a la especie *M. major* cosechada en diciembre del 2019 y al de *C. sinuosa*, recolectada en mayo del 2019. (se espera que durante el transcurso de este año se pueda terminar con el análisis de la composición de monosacáridos del resto de los extractos). La tabla 2 muestra los resultados obtenidos.

Muestra	Composición de Monosacáridos (%mol)					
	Fucosa	Galactosa	Xilosa	Arabinosa	Manosa	Glucosa
M.D	82,2 ± 7,8	2,1	2	-	-	13,6
C.M	46 ± 2,8	18,9	18,1	11,2	5,3	Tr

Tabla 2: Composición de monosacáridos (%mol) de los extractos de *M. major* y de *C. sinuosa* muestreadas en diciembre 2019 (M.D) en mayo del 2019 (C.M) respectivamente. (± SD, n=3)

Del extracto de la especie *M. major* cosechada en diciembre del 2019 se obtuvieron seis fracciones, 20,3 mg corresponden a la fracción 0 (F0), 10,0 mg a la fracción 1 (F1), 10,4 gm a la fracción 2 (F2), de la fracción 3 (F3) se obtuvieron 10,2 mg, mientras que de las fracciones F4 y F5 se alcanzaron 5,0 y 4,6 mg respectivamente.

Los rendimientos de fucoidanos obtenidos fueron superiores para la especie *M. major*. En el extracto de diciembre no hubo una diferencia significativa entre los rendimientos de los extractos fríos y calientes, pero en el extracto de enero el 58,5% del rendimiento total corresponde al extracto frío. La segunda especie que mostró mayores rendimientos fue *A. ensiformis*, donde sus extractos calientes mostraron un rendimiento ampliamente superior. Las muestras de *E. virescens* de enero mostraron un rendimiento mayor en el extracto frío. Al contrario de lo que sucedió con las otras especies, esta relación no se mantuvo y en el muestreo de febrero el rendimiento del extracto caliente fue levemente superior al del extracto frío. La especie que mostro los rendimientos más bajos fue *C. sinuosa*. Al contrario de lo que sucedió con *M. major* y al igual que con los resultados de *A. ensiformis*, los extractos calientes de *C. sinuosa* arrojaron los mayores rendimientos, superando el 80% del total en los extractos de ambos muestreos (ver gráfico 1).

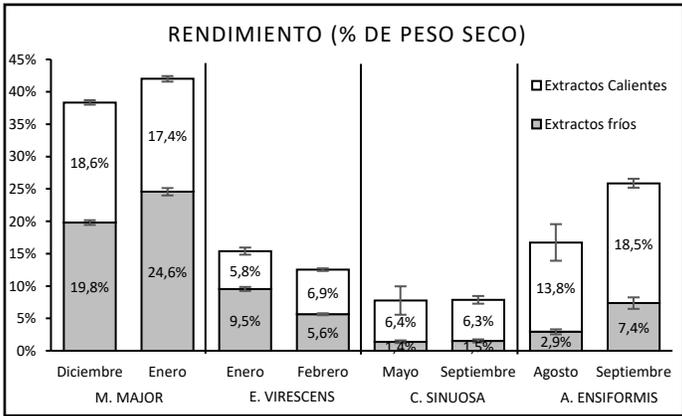


Gráfico 1: Rendimiento de fucoidanos (% de peso seco) de los extractos de *M. major* cosechada en diciembre 2019 y enero 2020. *E. virescens* cosechada en enero 2020 en febrero 2020. *C. sinuosa* cosechada en mayo 2019 y septiembre 2019. *A. ensiformis* cosechada en agosto del 2021 y septiembre del 2019. (n=3)

El contenido de esteres sulfatos fue superior para todas las especies en los extractos fríos (grafico 2.A). El extracto que mostró los mayores contenidos de sulfatos fue el de la especie *M. major*, correspondiente al muestreo de diciembre, similar al del extracto frío de enero y al obtenido con el extracto frío de *A. ensiformis*. La especie con menor contenido de sulfatos fue *C. sinuosa*. No se observaron diferencias significativas entre los extractos de las mismas especies, mismo tipo de extracto y cosechadas en diferentes momentos del año.

En cuanto al contenido de azúcares totales (gráfico 2.B), en las especies *A. ensiformis* y *M. major*, se observó un mayor rendimiento en los extractos fríos, mientras que *E. virescens* y *C. sinuosa* los extractos calientes mostraron mayores contenidos de azúcares totales. El contenido de azúcares totales de los extractos calientes de *M. major* superaron levemente el 50% en ambos casos y los extractos fríos de *Eudesme* y *Colpomenia* se mantuvieron levemente por debajo de este valor. Finalmente, los extractos calientes de *Asperococcus* arrojaron los valores más altos. No se observaron diferencias significativas entre los extractos de las mismas especies, mismo tipo de extracto y cosechadas en diferentes momentos del año.

Los extractos calientes de todas las especies arrojaron valores superiores a los fríos en cuanto al contenido de ácidos urónicos (gráfico 2.C), alcanzando valores máximos en los de *C. sinuosa*. Los extractos calientes de *A. ensiformis* y de *M. major* no mostraron variaciones entre las muestras de distintas fechas, a diferencia de los extractos calientes de *E. virescens* y *C. sinuosa* que mostraron incrementos en el contenido de ác. urónicos en el segundo muestreo para cada especie, mientras que sus extractos fríos se mantuvieron estables. Finalmente, los extractos fríos de *M. major* mostraron un leve incremento en el contenido de ácidos urónicos entre las muestras de diciembre y enero.

Hasta la fecha se realizaron las determinaciones del contenido de proteínas, solo en los extractos obtenidos a temperatura ambiente (gráfico 2.D), siendo los de *C. sinuosa* los que mostraron valores más altos. Los extractos de *M. major* y de *E. virescens* dieron los valores más bajos.

Del extracto de la especie *M. major* cosechada en diciembre del 2019 se obtuvieron seis fracciones, 20,3 mg corresponden a la fracción 0 (F0), 10,0 mg a la fracción 1 (F1), 10,4 gm a la fracción 2 (F2), de la fracción 3 (F3) se obtuvieron 10,2 mg, mientras que de las fracciones F4 y F5 se alcanzaron 5,0 y 4,6 mg respectivamente.

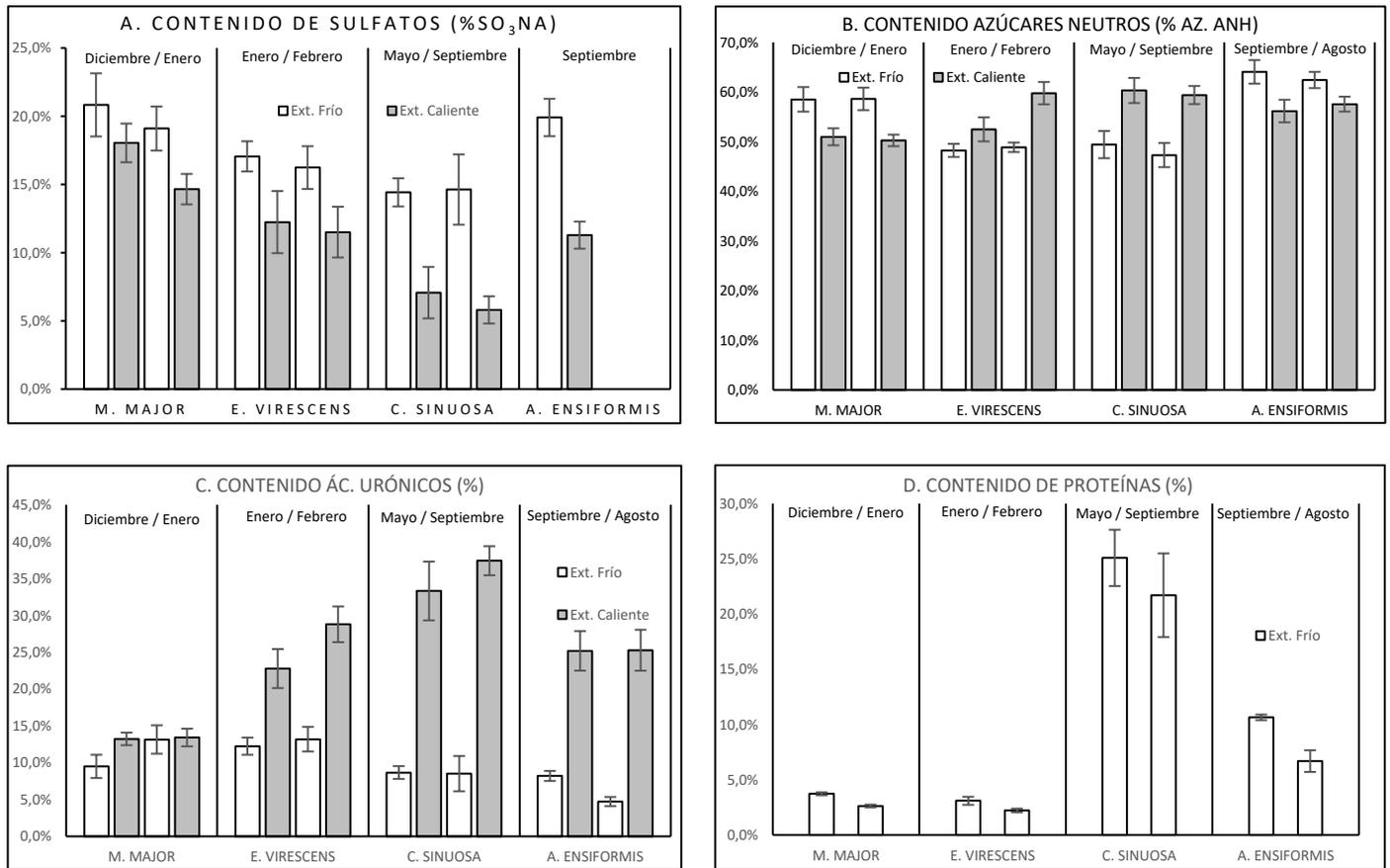


Gráfico 2: A. Contenido de sulfatos (%SO₃Na). B. Azúcares neutros (% azúcar anhidro). C. Ácidos urónicos (%). D. Proteínas totales (%). En los extractos de *M. major* cosechadas en diciembre del 2018 y enero 2019, *E. virescens* recolectadas en enero y febrero del 2020, *C. sinuosa* recogidas en mayo y septiembre del 2019 y *A. ensiformis* cosechadas en septiembre del 2019 y en agosto del 2021, para extractos fríos y calientes. (n=3)

Conclusiones

El rendimiento de los extractos de *M. major* fueron más altos que los del resto de las especies, especialmente los obtenidos a temperatura ambiente, mostrando valores superiores incluso a los reportados por Arijon (2021) utilizando el mismo método de extracción sobre tejido fértil de *Undaria pinnatifida* (una biomasa utilizada como fuente comercial de fucoidanos). El contenido de sulfatos de los extractos fríos de *M. major* también fueron de los más altos entre las cuatro especies y comparando con la información publicada de otras especies, el grado de sulfatación es semejante a los más altos registrados hasta la fecha (Ponce & Stortz, 2020) lo que proporciona altas expectativas del potencial bioactivo de los extractos de esta especie (Fitton et al., 2015). Además, la composición de monosacáridos de los extractos fríos cosechados en diciembre de *M. major* indica que los polisacáridos extraídos son del tipo "fucanos" con fucosa como monosacárido principal. Las proteínas constituyen contaminantes frecuentes en los extractos de fucoidanos, los extractos de *C. sinuosa* registraron valores ampliamente superiores al resto, mientras que los de *M. major* y *E. virescens* mostraron los valores más bajos. Los extractos calientes mostraron los mayores contenidos de ácidos urónicos, esto puede deberse a la presencia de ácido algínico que se hubiera co-extraído favorecido por la elevada temperatura y se encontrara como contaminante o como a ácido glucurónico, el cual fue informado como un integrante de los fucoidanos de algunas algas pardas ("uronofucoidanos") (Ponce & Stortz, 2020). Debe considerarse que, incluso usando solventes específicos la separación de alginatos y fucoidanos no es absoluta.

Los resultados preliminares indican que *M. major* produce mayores porcentajes de fucoidanos entre todas las especies analizadas, prácticamente puros y altamente sulfatados, lo que sugiere que esta especie podría ser un candidato adecuado para la producción de fucoidanos. Se necesitan estudios adicionales que incluyan una mayor elucidación estructural y pruebas biológicas.

Referencias

- Agardh, J. (1882). Till Algernes Systematik, Andra afdelningen. *Lunds Universitets Årsskrift*, 17, 1880-1881.
- Arijón, M., Ponce, N. M., Solana, V., Dellatorre, F. G., Latour, E. A., & Stortz, C. A. (2021). Monthly fluctuations in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* sporophylls from northern Patagonia. *Journal of applied phycology*, 1-9.
- Asensi, A. O. (1973). Una especie de alga Phaeophyta nueva para Argentina: *Myriogloia major* spec. nov. y el resultado de su cultivo "in vitro". *Darwiniana*, 18(1/2), 153-161.
- Boraso de Zaixso, A. (2013). Elementos para el estudio de las macroalgas de Argentina. *Con colaboración de JM Zaixso. Universitaria de la Patagonia, Comodoro Rivadavia*, 204.
- Castagne, L. (1851). *Supplément au catalogue des plantes qui croissent naturellement aux environs de Marseille*: Nicot et Pardigon.
- Dodgson, K., & Price, R. (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal*, 84(1), 106.
- Filisetti-Cozzi, T. M., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical biochemistry*, 197(1), 157-162.
- Fitton, J., Stringer, D., & Karpinić, S. (2015). Therapies from fucoidan: An update. *Marine drugs*, 13(9), 5920-5946.
- Klettner, A. (2016). Fucoidan as a Potential Therapeutic for Major Blinding Diseases—A Hypothesis. *Marine Drugs*, 14(2), 1-13.
- Lee, R. E. (2018). *Phycology*. New York: Cambridge university press.
- Liu, X., Liu, B., Wei, X., Shi, Y., Jia, A., & Wang, C. (2021). Structural elucidation of fucoidans from *Sargassum pallidum*. *Journal of applied phycology*, 33(1), 523-531.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193, 265-275.
- Ponce, N., & Stortz, C. A. (2020). A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1844.
- Wynne, M. J. (2003). The identity of *Laminaria ensiformis* Delle Chiaje (Phaeophyceae). *Webbia*, 58(2), 471-476.