

Extracción secuencial de los polisacáridos del alga parda *Adenocystis utricularis*

Nora M.A. Ponce^{1,2}, Analía V. Uhrich¹, María L. Flores¹ y Carlos A. Stortz^{*2}

¹Farmacognosia, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Patagonia, Chubut, Argentina;

²Depto. Química Orgánica-CIHIDECAR, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 1428, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

Adenocystis utricularis (familia Adenocystaceae; orden Ectocarpales *sensu lato*) es un alga parda que crece sobre el sustrato rocoso en las costas patagónicas del Atlántico Sur. La extracción de sus polisacáridos fue llevada a cabo por tratamiento secuencial con etanol al 80 % frío y caliente, solución de cloruro de calcio al 2 % frío y caliente, y finalmente con ácido clorhídrico diluido (pH 2) a 70 °C. El manitol fue el hidrato de carbono mayoritario en el extracto etanólico a temperatura ambiente, mientras que los fucoidanos y las proteínas fueron principalmente extraídos con etanol a 70 °C. Ambos extractos evidenciaron además la presencia de compuestos de naturaleza fenólica. Los demás extractos mostraron altas cantidades de hidratos de carbono y menores de proteínas: en todos ellos el principal monosacárido constituyente fue fucosa, con pequeñas proporciones de galactosa y manosa. Los ácidos urónicos y grupos ésteres sulfato fueron también constituyentes de los extractos.

Palabras clave: manitol, algas pardas, fucanos, fucoidanos, *Adenocystis utricularis*

Introducción

Las algas pardas (Phaeophyta) habitan preferentemente los ambientes marinos, en la zona intermareal llegando hasta 60-70 m de profundidad¹. Su composición de hidratos de carbono depende de cada especie y dentro de ella, del hábitat, de la época del año en que fue colectada, del tipo de tejido, etc. Como productos de reserva generalmente contienen laminaranos y manitol. Biosintetizan además, ácido alginico y fucoidanos, los cuales forman parte tanto de la pared celular

matricial como de la fibrilar. Estos últimos polisacáridos contienen grandes cantidades de L-fucosa y sulfato, junto con menores proporciones de otros azúcares tales como xilosa, galactosa, manosa y ácido glucurónico^{2,3}. El manitol y el ácido alginico poseen aplicaciones industriales, principalmente en la industria farmacéutica.

Los fucoidanos han demostrado una importante actividad biológica^{4,6}, fundamentalmente anticoagulante^{7,8}, anti-trombótica⁹ y antiviral^{6, 10}.

En este trabajo se presentan los resultados del estudio fitoquímico general y análisis de los hidratos de carbono constituyentes de los extractos de *Adenocystis utricularis* (familia Adenocystaceae; orden Ectocarpales *sensu lato*)^{11,12}, presente en las costas de la Patagonia argentina. Esta especie de alga parda aparece también en otras regiones del hemisferio sur, como Chile, Australia y Nueva Zelanda¹³. Presenta frondas globosas con forma de dedos, con el interior lleno de agua y habita en los altos niveles del sublitoral marino. En un trabajo reciente, hemos caracterizado polisacáridos con actividad antiviral presentes en este alga, obtenidos mediante extracción paralela¹⁴.

Materiales y Métodos

Obtención del material y extracción

El alga parda *Adenocystis utricularis* fue colectada en las costas cercanas a Comodoro Rivadavia, en el paraje conocido como "La Lobería" (Provincia de Santa Cruz, Argentina) en abril de 1998, secada al aire libre y luego bajo techo, y finalmente molida en un molinillo de paletas. El alga molida (84,9 g) fue extraída secuencialmente mediante una modificación de la metodología descrita por Mian y Percival¹⁵, utilizando agitación mecánica. La secuencia extractiva se

* Tel = Fax: + 54-11-45763346. E-mail: stortz@qo.fcen.uba.ar

muestra en la Figura 1. El alga fue extraída en primer lugar con etanol acuoso al 80 % (600 mL) por 24 h a temperatura ambiente y a 70 °C, dos veces en cada caso. Los marcros fueron recuperados por centrifugación y posteriormente extraídos con a) CaCl₂ acuoso al 2 % (300 mL) por 24 h, a temperatura ambiente y luego a 70 °C; b) HCl diluido (300 mL, pH 2,0) por 4 h (cuatro veces a 70 °C), manteniendo el pH a 2,0-2,1 por adición de HCl diluido.

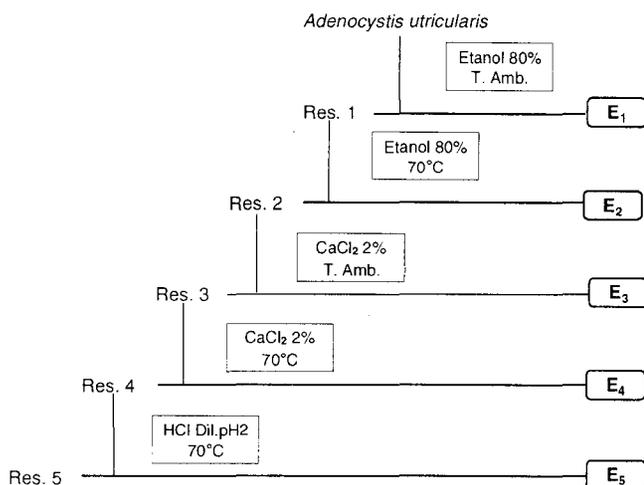


Figura 1. Extracción secuencial de *Adenocystis utricularis*.

El residuo insoluble final fue separado por centrifugación y liofilizado. Todos los extractos fueron concentrados a presión reducida, dializados (en una bolsa de poro 12.000) contra agua corriente por 48 h, contra agua destilada en sistema cerrado por 24 h, y finalmente liofilizados.

Métodos Analíticos

Los extractos E₁ y E₂ fueron analizados mediante la marcha fitoquímica cualitativa que se muestra en la Figura 2¹⁶. Los azúcares totales se cuantificaron por el método del fenol-H₂SO₄¹⁷. Los ácidos urónicos se determinaron utilizando la metodología propuesta por Filisetti-Cozzi y Carpita¹⁸, con glucuronolactona como estándar. Las proteínas solubles fueron cuantificadas por el procedimiento de Lowry *et al.*¹⁹. La proporción de éster sulfato se determinó turbidimétricamente como sulfato de bario luego de hidrólisis con HCl 1M a 105 °C^{20, 21}.

La hidrólisis de los polisacáridos fue llevada a cabo con TFA 2M, durante 90 min a 120 °C²². Los hidrolizados fueron derivatizados a los correspondientes aldononitrilos peracetilados²³ y analizados por cromatografía gas-líquido (GLC) usando una

columna capilar (30 m x 0,25 mm) SP-2330 en un cromatógrafo gaseoso HP-5890 equipado con un detector de ionización de llama. El flujo del gas portador fue de 1 mL/min. Las corridas cromatográficas se efectuaron isotérmicamente a 220 °C, con una relación de split de 1:100 mientras que la temperatura del inyector y detector fueron mantenidas a 235 °C.

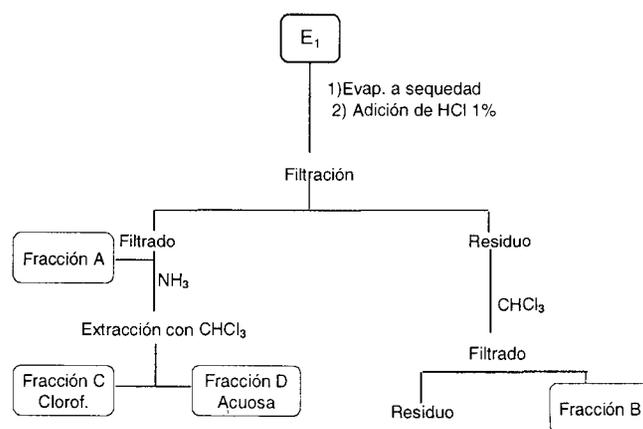


Figura 2. "Screening" fitoquímico de los extractos E₁ y E₂.

Alternativamente, los hidrolizados fueron analizados utilizando un equipo Dionex de HPAEC equipado con un detector de pulso amperométrico (PAD). Se utilizó una columna CarboPac PA-1 (250 x 4 mm), eluyendo isocráticamente con NaOH 20 mM^{24, 25}. Para la detección de manitol, los extractos E₁ y E₂ fueron analizados también por CGL y HPAEC-PAD sin hidrólisis previa.

Resultados y Discusión

El alga *Adenocystis utricularis* fue extraída secuencialmente con diferentes solventes (Figura 1). Los resultados del screening fitoquímico (Figura 2) de los extractos E₁ y E₂ se presentan en la Tabla 1. Estos extractos contienen hidratos de carbono, proteínas y compuestos fenólicos (probablemente taninos). Se ha informado que las algas pardas producen un número importante de sustancias fenólicas, fundamentalmente taninos derivados del floroglucinol²⁶, los que han evidenciado importante actividad biológica²⁷.

Tabla 1. Análisis preliminar de los extractos etanólicos de *Adenocystis utricularis*.

Fracción	Hid. de Carbono	Proteínas	Lípidos	Taninos	Flavonoides
E ₁	+	+	-	+	-
E ₂	+	+	-	+	-

La Tabla 2 muestra los análisis efectuados sobre todos los extractos obtenidos por extracción secuencial (Figura 1). Los mejores rendimientos se obtuvieron con el solvente hidroalcohólico a temperatura ambiente y a 70 °C (E_1 29 % y E_2 8 %). Estos extractos son también ricos en proteínas, cuyo contenido disminuye en las siguientes extracciones. Los ácidos urónicos fueron importantes constituyentes de los extractos de cloruro de calcio (E_3 y E_4), mientras que las cantidades de sulfato resultaron similares en la mayoría de los extractos (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de los extractos de *A. utricularis*.

	Rendimiento (%)	Hid. de Carbono (%)	Proteínas Solubles (%)	Ac. Urónicos (%)	Sulfato (%)
E1	29	-	18	-	-
E2	8	15	18	9	18
E3	1	40	3	24	19
E4	<1	37	1	13	21
E5	3	64	2	5	19

La composición de monosacáridos de todos los extractos se observa en la Tabla 3. Como es de esperar, el hidrato de carbono mayoritario en el extracto etanólico frío (E_1) fue el manitol. Sin embargo en caliente el producto extraído resultó enriquecido en componentes típicos de fucoidanos, al igual que en los siguientes extractos, en los que se observan grandes proporciones de fucosa, y menores de manosa y galactosa. La proporción de esta última crece en los últimos productos (E_4 y E_5 , Tabla 3).

Tabla 3. Composición de monosacáridos de los extractos de *Adenocystis utricularis* (mol/100 moles).

Monosacárido	E_1		E_2		E_3	E_4	E_5
	Hidrolizado	No hidr.	Hidroliz.	No hidr.			
Ram	-	-	3	-	-	3	1
Fuc	1	-	76	2	84	70	71
Ara	-	-	tr	-	-	1	tr
Xil	-	-	-	-	-	-	1
Man-ol	91	100	9	93	-	-	-
Man	-	-	3	-	5	7	11
Glc	tr	-	tr	-	tr	3	tr
Gal	8	tr	9	5	9	16	14

El manitol es un importante constituyente de muchas algas pardas. Se han encontrado grandes cantidades en *Himantothallus lorea*, *Bifurcaria bifurcata*, *Padina pavonia*¹⁵, *Ascoseira mirabilis*,

Desmarestia anceps, *D. menziessii* y *Himantothallus grandifolius*²⁸. *Adenocystis utricularis* no fue una excepción (Tablas 2 y 3).

Las subsecuentes extracciones dieron lugar a diferentes fracciones de fucoidanos, con altas proporciones de fucosa, pequeñas cantidades de galactosa y manosa, y proporciones despreciables de xilosa. En los fucoidanos de otras algas pardas, la L-fucosa y el ácido D-glucurónico fueron los principales componentes²⁹, usualmente acompañados por cantidades variables de D-galactosa y D-xilosa^{7, 15, 28} y algunas veces de D-manosa^{30,31}.

El laminarano es también un importante constituyente de muchas algas pardas^{15, 32, 28}. Sin embargo, en *Adenocystis utricularis* este polisacárido se halla ausente, ya que la proporción de glucosa resultó despreciable (< 3 %). Las proporciones de sulfato (18-21 %) fueron marcadamente superiores a aquellas descritas para fracciones similares²⁸ en *Ascoseira mirabilis* (12,5 %), *Himantothallus grandifolius* (4,7 %), *Desmarestia anceps* (1,6 %) y *D. menziessii* (1,4 %).

Considerando los resultados de la composición de azúcares de las algas pardas (además del ácido alginico), se pueden encontrar dos "extremos": uno con un fucano (> 80 % de fucosa) como el hidrato de carbono más importante, como ocurre en *Leathesia difformis*⁶, y el otro representado por algas que contienen manitol, laminaranos y fucoidanos complejos con unidades de monosacáridos variadas^{15, 28}. En este sentido, *Adenocystis utricularis* comparte muchas de las características de esas otras algas pardas. Sin embargo, se observa un comportamiento intermedio entre los dos extremos: posee manitol, pero no laminaranos, y la composición de sus fucoidanos no es exageradamente compleja.

Los productos extraídos con cloruro de calcio fueron escasos (Tabla 2), aunque presentan alta proporción y variedad de grupos aniónicos, a diferencia de lo observado en el producto obtenido por extracción directa con este solvente en frío¹⁴ o en otras algas pardas³, donde los galactofucanos presentan importantes porcentajes de sulfato, pero baja proporción de ácidos urónicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por UBA, CONICET, UNPSJB y CYTED-RIPRONAMED.

Referencias

1. Alveal Villena K.; *Primer Seminario Latinoamericano de capacitación pesquera*. Editora Aníbal Pinto S.A.; Concepción, Chile, 1990, 153 pp.
2. Percival E, McDowell RH. *Chemistry and enzymology of marine algal polysaccharides*, Academic Press, New York, 1967, pp 157-175.
3. Duarte, M.; Cardoso, MA.; Nosedá, MD.; Cerezo, AS. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333*, 281-293.
4. Nishino, T.; Nagumo, T. *Carbohydr. Res.* **1992**, *229*, 355-362.
5. Chizhov, AO.; Dell, A.; Morris, HR.; Haslam, S.M.; McDowell, RA.; Shashkov, AS.; Nifant'ev, N.E.; Khatuntseva, E.A.; Usov, A.I. *Carbohydr. Res.* **1999**, *320*, 108-119.
6. Feldman, S.; Reynaldi, S.; Stortz, CA.; Cerezo, AS.; Damonte, EB. *Phytomedicine*, **1999**, *6*, 335-340.
7. Nishino, T.; Nagumo, T.; Kiyohara, H.; Yamada, H. *Carbohydr. Res.* **1991**, *211*: 77-90.
8. Chevolot, L.; Mulloy, B.; Ratiskol, J.; Foucault, A.; Collic-Jouault, S. *Carbohydr. Res.* **2001**, *330*, 529-535.
9. Mauray, S.; Sternberg, C.; Theveniaux, J.; Millet, J.; Sinquin, C.; Tapon-Brethaudiere, J.; Fischer, A.M. *Thromb. Haemost.* **1995**, *74*, 1280-1285.
10. McClure, M.O.; Whitby, D.; Patience, C.; Gooderham, N.J.; Bradshaw, A.; Cheingsong-Popov, R.; Weber, J.N.; Davies, D.S.; Cook, G.M.; Keynes, R.J.; Weiss, R.A. *Antivir. Chem. Chemother.* **1991**, *2*, 149-156.
11. Peters, A.E.; Clayton, M.N. *Phycologia* **1998**, *37* (2), 106-113.
12. Rousseau, F.; De Reviere, B.; Leclerc, MC.; Asensi, A.; Delépine, R. *Eur. J. Phycol.* **2000**, *35*, 35-43.
13. Hoffmann, A.; Santelices, B.; *Marine Flora of Central Chile*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile, 1997, 434 pp.
14. Ponce, N.M.A.; Pujol, C.A.; Damonte, E.B.; Flores, M.L.; Stortz, CA.; *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 153-165.
15. Mian, A.J.; Percival, E.; *Carbohydr. Res.* **1973**, *26*, 133-146.
16. Rondina, R.V.D.; Coussio, J.D. *Rev. de Investig. Agropecuarias INTA, Serie II Biología y Producción Vegetal* **1969**, *6* (22), 351-366.
17. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F.; *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350-356.
18. Filisetti-Cozzi, T.M.C.C.; Carpita, N.C.; *Anal. Biochem.* **1991**, *197*, 157-162.
19. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Russel, R.J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
20. Dodgson, K.S.; *Biochem. J.* **1961**, *78*, 312-319.
21. Dodgson, K.S.; Price, R.G.; *Biochem. J.* **1962**, *84* 106-110.
22. Morrison, I.M.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1097-1100.
23. Turner, S.H.; Cherniak, R.; *Carbohydr. Res.* **1981**, *95*, 137-144.
24. Kerhervé, P.; Charrière, B.; Gadel, F.; *J. Chromatogr. A* **1955**, *718*, 283-289.
25. Flores, M.L.; Stortz, C.A.; Rodríguez, M.C.; Cerezo, A.S. *Bot. Mar.* **1997**, *40*, 411-419.
26. Ragan, M.A.; Glombitza, K.W. *Prog. Phycol. Res.* **1986**, *4*, 129-241.
27. Targett, N.M.; Arnold, T.M. *J. Phycol.* **1998**, *34*, 195-205.
28. Espinoza, S.; Matsuhiro, B. *Ser. Cient. INACH* **1992**, *42*, 61-68.
29. Zhuang, C.; Itoh, H.; Mizuno, T.; Ito, H. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1995**, *59*, 563-567.
30. Abdel-Fattah, A.F.; Hussein, M.M.; Salem, H.M. *Carbohydr. Res.* **1974**, *33*, 9-17.
31. Nishino, T.; Nishioka, C.; Ura, H.; Nagumo, T. *Carbohydr. Res.* **1994**, *255*, 213-224.
32. Carlberg, G.; Percival, E.; Rhaman, M.A.; *Phytochemistry* **1978**, *17*, 1289-1292.