

## Efecto del tratamiento de extracción en las características de fucoïdan de *Sargassum sinicola* del Golfo de California

Vargas González G. <sup>a\*</sup> Ibarra González P. A. <sup>a</sup>, Sandoval Larios G. <sup>b</sup>, Guzmán Partida A.M <sup>b</sup>, Ramos Clamont Montfort G. <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas. Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos Orientados a la Salud. Carretera Torreón -Matamoros Km. 7.5. C.P. 27104 Torreón, Coahuila, México.

<sup>b</sup> Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Laboratorio de Función y Funcionalidad de Proteínas y Glicanos. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán No 46, Colonia la Victoria. C.P. 83304. Hermosillo, Sonora, México.

\* [gramos@ciad.mx](mailto:gramos@ciad.mx).

### RESUMEN

El fucoïdan es un bioactivo, con potencial nutraceutico. Este polisacárido se encuentra principalmente en las algas marinas cafés (clase Phaeophyceae). Para determinar la concentración y propiedades del fucoïdan de *Sargassum sinicola* se realizaron seis colectas en varios puntos de las costas de Sonora. Las algas se clasificaron, lavaron, y secaron (humedad, 4%), se molieron y tamizaron. Los lípidos y parte de los pigmentos se extrajeron con etanol. Posteriormente se utilizaron dos métodos para extraer el fucoïdan, el primero (A) en condiciones ácidas (0.1M HCl) y el segundo (B) a estas condiciones, y añadiendo formaldehido [0.1%] final, con propósito de blanqueo. Se obtuvieron rendimientos de 3.4±0.58 % y 4.2±1.45% para Ay B, respectivamente, sin que hubiera diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en el parámetro de transparencia  $L^*$  (56.80±5.47). Sin embargo, los espectros de infrarrojo con transformada de Fourier mostraron que el método B produjo una desulfatación del fucoïdan, lo cual se confirmó al observar una reducción de la carga superficial obtenida mediante dispersión dinámica de la luz donde la carga del fucoïdan A fue de -18±0.25 mv y la del B de -9.8 ±0.85 mV. El método de extracción es importante porque algunas bioactividades del fucoïdan dependen de su grado de sulfatación.

**Palabras clave:** Algas pardas, bioactivos, fucoïdan

### ABSTRACT

Fucoïdan is a biologically active sulfated polysaccharide synthesized y brown alga (class Phaeophyceae). To determine the concentration and properties of the fucoïdan from *Sargassum sinicola*, six collections were made at various points along the coast of Sonora. The seaweeds were classified, washed and dried ((moisture content, 4%), ground, and sieved. The lipids and part of the pigments were extracted with ethanol. Subsequently, two methods were used for fucoïdan extraction, the first (A) under acid conditions (0.1M HCl) and the second (B) under these conditions, and adding 0.1% formaldehyde final concentration, for bleaching purposes. Yields of 3.4±0.58% and 4.2±1.45% were obtained for A and B, respectively, with no significant difference ( $p>0.05$ ) in the transparency parameter  $L^*$  (56.80±5.47). However, Fourier transform infrared spectra showed that method B produced a desulfation of fucoïdan, which was confirmed by observing a reduction in surface charge obtained by dynamic light scattering where the charge on fucoïdan. Fucoïdan extracted by method A had a surface charge of - 18±0.25 mv and that of B was -9.8 ±0.85 mV. The extraction method is important because some bioactivities of fucoïdan depend on its degree of sulfation.

**Keywords:** Brown algae, bioactive, fucoïdan

## INTRODUCCIÓN

Las macroalgas, también conocidas como algas marinas, pertenecen a uno de varios grupos de algas multicelulares; algas marrones, rojas y verdes. Esta biomasa ha sido utilizada como alimento, medicamento y fuente de bioactivos por culturas que habitan Asia y el Norte de Europa. Un bioactivo importante por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes y anticoagulantes es el fucoidan. Actualmente se consume como nutraceutico y se estudia su potencial para incorporarlo en alimentos funcionales (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). El fucoidan es un polisacárido rico en L-fucosas, las cuales pueden estar sulfatadas; también se encuentran pequeñas cantidades de otros monosacáridos; Este carbohidrato forma parte de la pared celular de las algas pardas (Phaeophyceae) y está presente en algunos invertebrados marinos como los erizos y pepinos de mar (Li *et al.*, 2008). Comercialmente se obtiene a partir de las algas *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* (Wang *et al.*, 2019). Tiene una masa molecular que varía de 13 a 950 kDa, y constituye del 3 % al 10 % de la biomasa de algas secas, dependiendo de la especie y el periodo de recolección. (Deniaud-Bouët *et al.*, 2017). El grado de sulfatación se encuentra relacionado a la bioactividad del fucoidan, sobre todo en aquellas actividades en las que la carga negativa es importante para que este carbohidrato interactúe con otras moléculas, por ejemplo, para el caso de evitar la formación de coágulos y disminuir los efectos de la hipertensión (Wang *et al.*, 2019).

El aislamiento de polisacáridos a partir de algas marinas consiste en una serie de procesos que incluyen la preparación del alga, el pretratamiento, la extracción de los polisacáridos y su aislamiento; si quieren purificarse, se tendrán que añadir operaciones unitarias adicionales (Dobrinčić *et al.*, 2020). La preparación consiste en secar el alga a temperatura ambiente y posteriormente molerla para aumentar el área de contacto con los solventes que se usarán para la extracción de los polisacáridos (Lim *et al.*, 2017). El pretratamiento se realiza con la finalidad de evitar o reducir la extracción de componentes no deseados como pigmentos, lípidos y polifenoles. Para esto, se pueden usar solventes con diferente grado de polaridad como el hexano, éter etílico, cloroformo y etanol, entre otros (Fernando *et al.*, 2019).

Las técnicas convencionales para la extracción de polisacáridos de las algas marinas consisten en el uso de agua o soluciones acuosas ácidas a altas temperaturas. Comúnmente se utiliza agua o ácido clorhídrico en una concentración 0.1 M para romper la pared celular del alga y, dependiendo de la especie, se aplican diferentes condiciones de tiempo y temperaturas altas para optimizar el proceso. La composición y la cantidad de fucoidan están altamente influenciados por el pH, la temperatura (30-90 °C) y el tiempo de reacción (1-5 horas), por lo que estos factores deben ser optimizados de forma simultánea (Flórez-Fernández *et al.*, 2018). Después de solubilizar a los polisacáridos, el alginato se puede extraer con carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) para realizar la conversión de ácido algínico a alginato de sodio y posteriormente se purifica. Otra alternativa es la utilización de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) para formar alginato de calcio. Después de separar el alginato, la solución remanente que contiene al fucoidan se somete a una purificación para remover proteínas, ácido algínico y otros compuestos de bajo peso molecular (Dobrinčić *et al.*, 2020). El fucoidan crudo se extrae por precipitación utilizando etanol como solvente. Esta precipitación permite al mismo tiempo separar impurezas de bajo peso molecular no deseadas. Para remover componentes disueltos que no se pudieron separar, se utilizan métodos de purificación como la separación por membranas, intercambio iónico, cromatografía por exclusión de tamaño y cromatografía de afinidad (Dobrinčić *et al.*, 2020).

Los sargazos pertenecen a la familia Sargassaceae, orden Fucales, clase Phaeophyceae y género *Sargassum*. La mayoría de sus especies crecen fijadas a las rocas, aunque existen algunas pocas especies pelágicas, entre las que se encuentran aquellas que arriban desde el 2011 a las playas del Caribe mexicano. En este estudio nos enfocamos a *Sargassum sinicola* por ser la especie más abundante en el Golfo de California, constituyendo más del 70% de los bosques de algas marinas de esta región

(Casas-Valdez *et al.*, 2016). El alga se fija en las superficies de piedras, rocas o cantos rodados por medio de un rizoide cónico. A partir del rizoide se forma el eje central o estipe con sus respectivas ramificaciones (Norris, 2010). El largo al que crecen se encuentra entre 0.6 a 2.1 m, pudiendo encontrarse desde el golfo de Santa Clara en la costa noroeste de Sonora hasta el Cabo San Lucas en Baja California Sur (Casas-Valdez *et al.*, 2016). La especie se ha estudiado como alimento para ganado caprino y aviar. Sin embargo, no se utiliza comercialmente. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del tratamiento de extracción en el rendimiento, características moleculares (evaluadas mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier), carga superficial y tamaño de partícula, de fucoïdan extraído a partir de *Sargassum sinicola* del Golfo de California. El fucoïdan se obtuvo mediante el método ácido, comparándolo con un método ácido modificado a fin de obtener un compuesto más claro. Debido que este método de aclaramiento se ha probado para la extracción del alginato, que es el otro polisacárido obtenido a partir de las algas pardas, la hipótesis inicial fue que dicho tratamiento no afecta la estructura del fucoïdan.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Lugar, área de trabajo

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos Orientados a la Salud (CyTAOS), en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC) en Torreón, Coahuila, y en el Laboratorio de Función y Funcionalidad de Proteínas y Glicanos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD) en Hermosillo, Sonora.

#### Recolección y preparación de las algas

Para la caracterización del sargazo y la extracción de fucoïdan, se realizaron seis colectas de *S. sinicola* en las costas sonorenses del Mar de Cortés. Los muestreos se llevaron a cabo en Bahía de Bacochibampo, San Pedro Nolasco y playa Estero del Soldado, durante los meses de junio de 2018 y 2019. Las algas se clasificaron, enjuagaron con agua dulce y se extendieron en un secador solar hasta que alcanzaron una humedad  $\leq$  a 4 %. Posteriormente, se tamizaron para eliminar impurezas, se molieron (Nbulet 900, Homeland Housewares, LLC, China) y se tamizaron nuevamente. La harina obtenida se envasó en recipientes plásticos a temperatura ambiente, hasta su posterior análisis.

#### Pretratamiento de harina de *S. sinicola* para la extracción de lípidos y pigmentos

Se mezcló harina de *S. sinicola* con etanol al 96 % en una relación de 1:10 (p/v). La mezcla se dejó en agitación (SP131325 Stirring Digital, Thermo Scientific USA) constante durante 16 h a 25°C. Posteriormente, los sólidos se separaron por decantación y se repitió la operación hasta que el etanol quedo claro. Los sólidos se extendieron en una superficie de vidrio secándose a temperatura ambiente antes de continuar con la extracción.

#### Extracción de fucoïdan

Para el Método A, se procedió como sigue. A la harina de alga se le añadió ácido clorhídrico 0.1 M en proporción 1:20 colocando la mezcla en baño María con agitación a 65°C durante 1h. Posteriormente se filtró a vacío agregando al NaOH 3 M gota a gota hasta pH neutro. El sobrenadante se ajustó a una concentración final de etanol de 70%, utilizando etanol al 96 %; se dejó precipitar a 6 °C durante 24 h, recuperando el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min, a 4 °C. (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) . EL precipitado se resuspendió en agua deionizada, agregándole una solución de CaCl<sub>2</sub> 3 M hasta ajustar a una concentración de

CaCl<sub>2</sub> 2 M. La mezcla se dejó en constante durante 4 h a 25 °C; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para extraer el fucoïdan, añadiéndole ácido tricloroacético en cristales hasta ajustar a una concentración de ácido del 10 % dejándolo en reposo a 25°C por 4 h para precipitar a las proteínas presentes, las cuales se separaron por centrifugación a 3000 rpm durante 30 min, a 25 °C. Al sobrenadante se le añadió etanol frío al 96 % dejándolo a 6 °C por 24 h para precipitar al fucoïdan. Después de obtenerlo por centrifugación (3000 rpm durante 30 min y 4 °C), se dejó secar a temperatura ambiente en un desecador herméticamente sellado. Para el método B se siguió el mismo procedimiento con la diferencia de que al sobrenadante de la extracción con HCl se le añadió formaldehído al 37 % hasta obtener una concentración final del 0.1 %, dejándolo en reposo durante 1 h a 50 °C y a continuación filtrando al vacío, antes de continuar con la primera adición de etanol (McHugh, 1987). Se realizaron un total de 10 extracciones independientes, para cada método.

### Rendimiento

El rendimiento del fucoïdan extraído por ambos métodos se obtuvo en base al peso de la muestra mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{peso del alginato seco}}{\text{peso del polisacárido seco}} * 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

### Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier y Reflexión Total Atenuada (FTIR-ATR)

El análisis de los grupos funcionales del fucoïdan, se llevó a cabo mediante FTIR-ATR en un espectroscopio Cary 630 FTIR (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó un rango espectral de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup> con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Los análisis se hicieron por triplicado graficando el promedio de las absorbancias obtenidas en cada réplica. Se utilizó el software SigmaPlot versión 11 para obtener los espectros los cuales fueron analizados en base a las absorbancias de los grupos funcionales presentes en polisacáridos y polisacáridos sulfatados.

### Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El tamaño de la molécula de fucoïdan y el índice de dispersión del tamaño, se determinaron en un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instrument Ltd., Worcestershire, UK) utilizando agua desionizada como diluyente. Se prepararon soluciones de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Las mediciones se hicieron por triplicado con 100 lecturas para cada una de las réplicas. Antes de analizar cada muestra, se llevó a cabo una homogenización durante 3 min un en vórtex, para evitar la formación de agregados. La carga de la molécula se determinó también por DLS, utilizando el mismo equipo, programándolo para medir la potencial zeta. Las determinaciones se hicieron por triplicado

### Estimación del contenido de proteína

La concentración de proteínas en el fucoïdan se estimó mediante el método Bradford (1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Los resultados se expresaron como mg de proteína/g de peso seco del polisacárido.

### Determinación de color y actividad de agua

Para la determinación del color del fucoïdan se obtuvo el parámetro L\* que indica luminosidad (0=negro, 100= blanco), Se utilizó un colorímetro Konica Minolta CR-400/410 (Minolta, Japón). Se

realizaron por lo menos tres mediciones para cada extracción. La actividad de agua ( $A_w$ ) se determinó con un medidor de  $A_w$  AQUALAB PAWKIT (España).

### Análisis estadístico

Todos los análisis fueron por triplicado. Se presenta la estadística descriptiva (media y desviación estándar de los resultados). Para el caso del color se realizó un ANOVA de una vía y análisis de Tuckey para determinar diferencias ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de fucoídano extraído en base al peso del alga utilizada fue de  $3.4 \pm 0.58$  y  $4.2 \pm 1.45$  % para los métodos A y B respectivamente. El color del fucoídano obtenido en ambos métodos fue café claro el cual es característico de los aislados de fucoídano (Azeem *et al.*, 2017). No hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) al determinar el parámetro  $L^*$  en los dos fucoídanos  $L^*$  ( $56.80 \pm 5.47$ ), indicando que el tratamiento de blanqueo no fue efectivo para este carbohidrato, mientras que el contenido de proteína fue de  $28.6 \pm 3.3$  y  $30.2 \pm 2.3$  mg de proteína /g de fucoídano para los fucoídanos obtenidos por el método 1 y el método 2, respectivamente. Estos contenidos son similares a los reportados por otros autores (Wang y Chen, 2016). La  $A_w$  fue de  $0.18 \pm 0.00$  y  $0.19 \pm 0.01$  para los fucoídanos de los métodos A y B, respectivamente, indicando que el polvo obtenido puede tener una larga vida de anaquel.

### Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier con Reflexión Total Atenuada (FTIR\_ATR)

La figura 1 muestra el espectro típico del fucoídano obtenido por el método 1. Se presentó una banda entre los 3000 y 3500  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuye a los grupos OH, (muy abundantes en los polisacáridos, por ser de naturaleza polihidroxilica. El pico observado en valores cercanos a los 2900  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a grupos C-H. La huella dactilar de los carbohidratos se presenta en la región de 1800 a los 800  $\text{cm}^{-1}$ . La banda a 1600 a 1622  $\text{cm}^{-1}$  se asocia con el grupo C=O, de ácido urónico presente en pequeñas cantidades en el fucoídano. Las bandas entre 1418 y 1420  $\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a la vibración de tensión del grupo -COOH mientras que la señal característica de los polisacáridos sulfatados y debida a los grupos S=O, se presentó alrededor de los 1220  $\text{cm}^{-1}$ , esta es una prueba de lo que se extrajo es fucoídano ya que el alginato no está sulfatado. La señal cercana a los 1000  $\text{cm}^{-1}$  se atribuye a los enlaces glucosídicos típicos de los polisacáridos. La vibración de flexión del enlace C-O-S quedó registrada entre los 820 y los 840  $\text{cm}^{-1}$ , esto sugiere que los grupos sulfato se encuentran mayoritariamente en los C4 y C2 de la fucosa (Zou *et al.*, 2021).

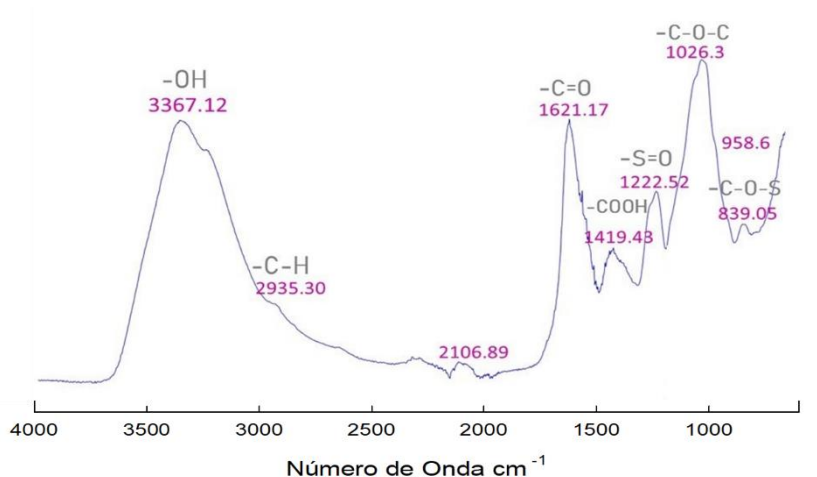


Figura 1. Espectro FTIR-ATR típico de fucoídano de *S. sinicola* extraído por el método 1.

La Figura 2 muestra el espectro del fucoídano obtenido en este trabajo mediante en método 1 con el espectro del fucoídano de *Sargassum bindieri* obtenido por Saepudin *et al.* (2017); se puede observar que ambos presentan el mismo patrón, aunque con diferencias principales en los grados de sulfatación. Esto confirma que lo que se extrajo fue fucoídano.

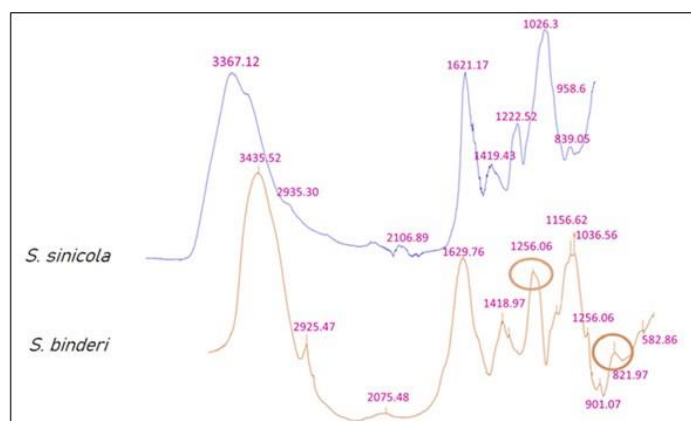


Figura 1. Comparación de espectros FTIR-ATR de *S. sinicola* y *S. bindieri*.

En la figura 3. Se muestran los espectros de varias extracciones de fucoídano obtenido por el método 2. Lo que resulta más notable al compararlos con la figura 1 es la desaparición del pico correspondiente a los grupos S=O lo que puede estar indicando una desulfatación del fucoídano, ya que el pico correspondiente a los C-O-S (820  $\text{cm}^{-1}$ ) si aparece. Los picos asignados a los enlaces carboxílicos también disminuyeron indicando que la presencia del formaldehído pudo haber afectado a la estructura del fucoídano.

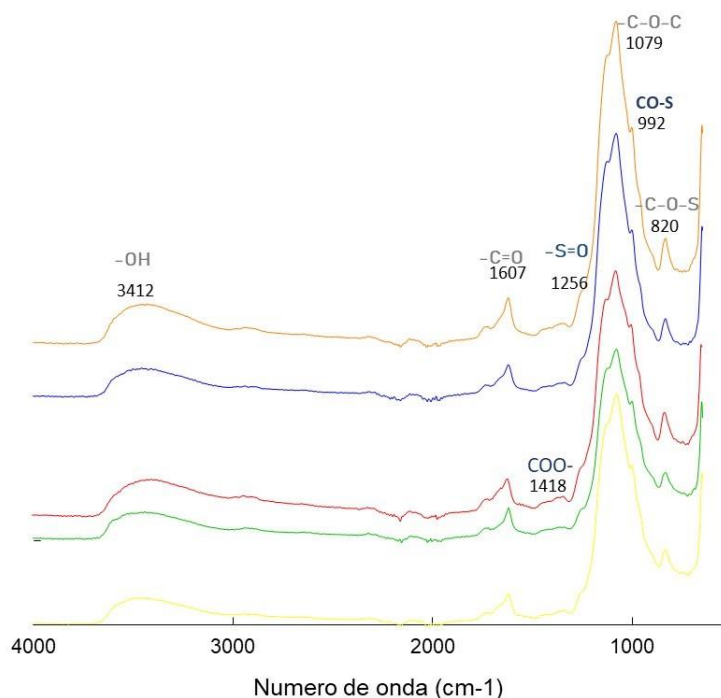


Figura 3. Espectros FTIR-ATR de las extracciones de fucoidan utilizando el método 2.

La molécula de fucoidan extraída de *S. sinicola* por el método 1, presentó una carga de  $-18.3 \pm 0.25$  mv. En contraste, la molécula obtenida por el método 2 fue muy heterogénea presentando cargas superficiales de  $-9.81 \pm 0.85$  (Figura 4). Esto es un indicio de que la molécula pudo de desulfatarse durante la obtención. El índice de polidispersidad del fucoidan obtenido por el primer método fue de 0.45 mientras que el del método 2 fue de 0.9. El índice de polidispersidad indica la diversidad de poblaciones de diferentes tamaños presentes en una muestra, es una medida adimensional cuyo valor máximo es 1. Por tanto, las poblaciones de moléculas con diferentes tamaños presentes en el fucoidan extraído mediante el método dos fueron mayores que las del método siendo un indicativo indirecto de que pudo haberse presentado degradación de la molécula debida a la presencia del formaldehído.

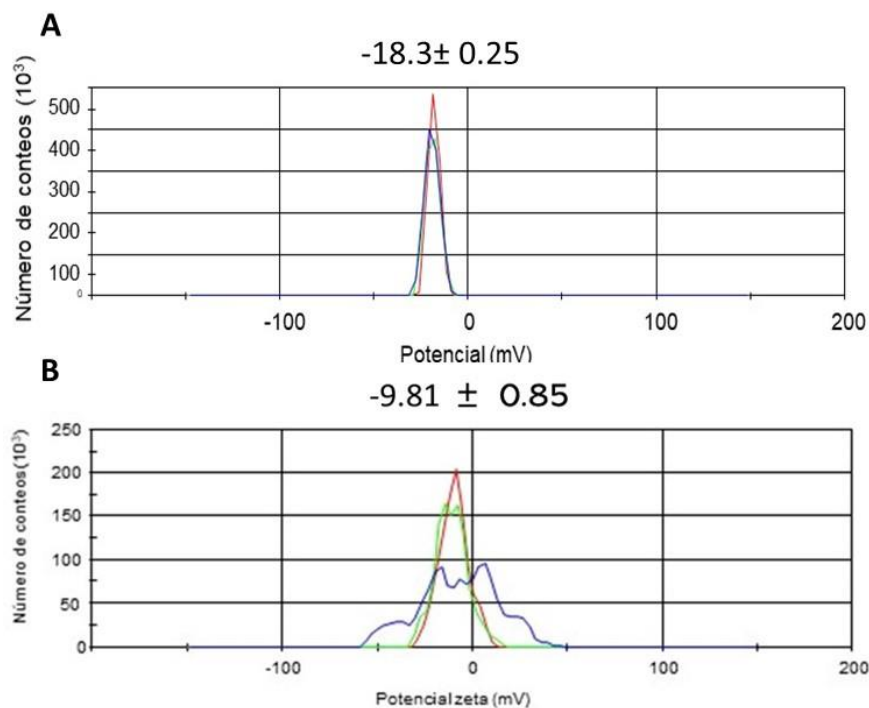


Figura 4. Carga superficial de la molécula de fucoidan a) Método 1; b) Método 2

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que el método de blanqueo utilizando formaldehído no es efectivo para aclarar el color del fucoidan y puede afectar su estructura, particularmente su grado de sulfatación, el cual está ligado a algunas de sus actividades biológicas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Casas-Valdez, M., Sánchez-Rodríguez, I., Serviere-Zaragoza, E., & Aguila-Ramírez, R. N. (2016). Temporal changes in the biomass and distribution of *Sargassum* beds along the southeastern coast of the Baja California Peninsula. *Ciencias marinas*, 42(2), 99-109.
- Deniaud-Bouët, E., Hardouin, K., Potin, P., Kloareg, B., & Hervé, C. (2017). A review about brown algal cell walls and fucose-containing sulfated polysaccharides: Cell wall context, biomedical properties and key research challenges. *Carbohydrate Polymers*, 175, 395-408.
- Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., & Dragović-Uzelac, V. (2020). Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Marine drugs*, 18(3), 168. doi:10.3390/md180301.
- Fernando, I. S., Kim, D., Nah, J. W., & Jeon, Y. J. (2019). Advances in functionalizing fucoidans and alginates (bio) polymers by structural modifications: A review. *Chemical Engineering Journal*, 355, 33-48.
- Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., González-Muñoz, M. J., & Domínguez, H. (2018). Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal research*, 30, 128-148.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13(8), 1671-1695.



- Lim, S. J., & Aida, W. M. W. (2017). Extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. In *Seaweed Polysaccharides* (pp. 27-46). Elsevier.
- Saepudin, E., Sinurat, E., & Suryabrata, I. (2017). Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 299, 012027. <https://doi.org/10.1088/1757-899x/299/1/012027>
- McHugh, D. J. (1987). Production, properties and uses of alginates. *Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO. Fish. Tech. Pap*, 288, 58-115.
- Norris, J. N. (2010). Marine algae of the northern Gulf of California: Chlorophyta and Phaeophyceae. *Smithsonian contributions to botany*. 210-213.
- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., & Song, S. (2019). Biological activities of fucoidan and the factors mediating its therapeutic effects: A review of recent studies. *Marine Drugs*, 17(3), 183.
- Zou, P., Yang, X., Yuan, Y., Jing, C., Cao, J., Wang, Y., & Li, Y. (2021). Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae *Macrocystis pyrifera* and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings. *Int J Biol Macromol*, 180, 547-558.