

## Hidratos de carbono en algas pardas de la Antártica

SERVANDO ESPINOZA y BETTY MATSUHIRO<sup>1</sup>

### RESUMEN

*Las algas pardas* *Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziessii* e *Himantothallus grandifolius* de la Antártica se extrajeron en forma secuencial con soluciones acuosas de etanol 80%, cloruro de calcio 2%, ácido clorhídrico diluido y carbonato de sodio al 3%. El análisis de los extractos etanólicos de todas las especies condujo a la identificación del monosacárido D-manitol. Por cromatografía de intercambio iónico de los extractos obtenidos con cloruro de calcio se aislaron polisacáridos neutros formados de glucosa, indicando la presencia en todas las especies de polímeros tipo laminarano. La hidrólisis total de los extractos ácidos y el análisis posterior por cromatografía mostró la presencia de fucosa, galactosa, glucosa y ácido glucurónico. Finalmente, la extracción con carbonato de sodio condujo a la obtención de ácido alginico.

La extracción directa de láminas y discos de las cuatro especies con carbonato de sodio dio ácido alginico, con rendimientos entre 4,8 y 16,1%. La relación ácido manurónico a ácido gularónico encontrada para las diferentes muestras varió entre 0,14 y 2,9.

Palabras claves: Ácido alginico, hidratos de carbono, D-manitol, Phaeophyta.

## Carbohydrates in Antarctic brown seaweeds

SERVANDO ESPINOZA and BETTY MATSUHIRO<sup>1</sup>

### ABSTRACT

*The brown seaweeds* *Ascoseira mirabilis*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziessii* and *Himantothallus grandifolius* of the Antarctica were sequentially extracted with 80% ethyl alcohol, 2% calcium chloride, diluted hydrochloric acid and 3% sodium carbonate aqueous solutions. The ethanolic extracts from the four seaweeds gave the monosaccharide D-mannitol. The neutral fractions obtained by ion-exchange chromatography of the CaCl<sub>2</sub> extracts showed by total hydrolysis to be composed of glucose indicating the presence of laminaran-type polysaccharides. Polysaccharides extrated with HCl showed by total hydrolysis and chromatography to contain fucose, galactose and glucuronic acid. Finally, the sodium carbonate extracts afforded alginic acid.

Direct extraction of blades and haptera of the four species afforded alginic acid (4.8-16.1% yield). The mannuronic to gularonic acid ratio in the alginic acid samples varies between 0.14 to 2.9.

Key words: Alginic acid, carbohydrates, D-mannitol, Phaeophyta.

<sup>1</sup>Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Santiago de Chile, Casilla 307, Santiago 2.

## INTRODUCCIÓN

Las algas de la división Phaeophyta sintetizan además de celulosa, una variedad de hidratos de carbono que pueden ser extraídos con soluciones acuosas. Se ha encontrado en todas las especies estudiadas la presencia de ácido algínico, el polímero lineal de los ácidos  $\alpha$ -L-gulurónico y  $\beta$ -D-mannurónico unidos en bloques homopoliméricos y en bloques alternados a través de enlaces 1 - > 4. Además, los polisacáridos laminarano y la familia de polímeros de fucosa han sido aislados de especies de los órdenes Laminariales y Fucales (Percival y McDowell, 1967). También se ha descrito la presencia de hidratos de carbono de peso molecular bajo, como D-manitol, en todas las algas pardas.

La composición en hidratos de carbono depende de cada especie y dentro de cada especie del hábitat, de la época del año en que fue cosechada, del tipo de tejido, etc. Por ejemplo, para algas pardas de Chile continental, del orden Laminariales, se ha encontrado que *Lessonia trabeculata* (Matsuhira y Zambrano, 1990) contiene 3,4% de D-manitol, 0,3% de laminarano, 6,8% de mezclas de fucanos y 23% de ácido algínico; mientras que no se ha detectado la presencia de laminarano en *L. nigrescens* (Percival *et al.*, 1983). La composición de los fucanos para ambas especies es similar y diferente del fucano altamente sulfatado encontrado en *L. flavicans* (Villaruel y Zanlungo, 1975).

En este trabajo se presentan los resultados del análisis del contenido de hidratos de carbono en cuatro especies de la División Phaeophyta, típicas de la Antártica (Ramírez, 1982).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies *Ascoseira mirabilis* Skottsberg, *Desmarestia anceps* Montagne y *Desmarestia menziessii* Agardh fueron recolectadas en bahía Collins (62°10'S, 58°50'W), en enero de 1989, durante la XXV Expedición Científica Antártica, por Carlos C. Urzúa y Patricio Camus e identificadas por este último. Las algas se secaron en estufa a 45°C en las dependencias del INACH en la base Teniente Marsh y se transportaron al laboratorio. *Himantothallus grandifolius* (A. y E.S. Gepp) Moe y Silva fue recolectada por el Dr. Renato Westermeier en enero de 1988 en bahía Elefante, isla Rey Jorge.

Las cromatografías (CP) se efectuaron en papel Whatman N° 1 en los sistemas: A) 1-butanol-etanol-agua 4:1:5, B) 1-butanol-ácido acético-agua 4:1:2 y C) acetato de etilo-piridina-agua 8:2:1. Los azúcares reductores se visualizaron con el reactivo nitrato de plata-hidróxido de sodio (Chaplin y Kennedy, 1986) y los ácidos urónicos con el reactivo p-anisidina-HCl (Whistler y Wolfrom, 1968). El contenido de sulfato se determinó según la técnica de Dogson (1961). Las cromatografías gas-líquido (CGL) se realizaron en un cromatógrafo Varian 3700 provisto de un par de columnas de acero inoxidable de 2,0 m x 2 mm. Como soporte se usó Chromosorb W y como fases estacionarias: D) SP 2340 y E) ECNSS-M 3%. Como gas portador se empleó nitrógeno a un flujo de 20 mL/min y se usaron detectores de ionización por llama. Los análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizaron en un equipo Merck Hitachi modelo 655 A-12 provisto de un detector ultravioleta y un microprocesador de datos D-2000.

### Extracción secuencial

Láminas de alga seca y molida (50 g) se extrajeron en forma secuencial con soluciones acuosas de etanol 80% cloruro de calcio 2%, ácido clorhídrico diluido (pH=2) y carbonato de sodio 3% según la técnica de Mian y Percival (1973).

### Extracción directa

Muestras de lámina y disco, limpias y molidas se sumergieron en formaldehído durante 24 horas,

el sobrenadante se decantó y las muestras se secaron al aire. Cada muestra se sometió a cinco extracciones sucesivas con solución acuosa de carbonato de sodio al 3% durante 4 horas a 50°C. Los extractos reunidos correspondientes a cada muestra, se diluyeron en tres veces su volumen de agua destilada y se filtraron a través de malla de nylon. Se concentraron al vacío hasta jarabe y se volcaron en un volumen de EtOH igual a cinco veces su volumen. Los extractos obtenidos se purificaron según la técnica ya descrita (Matsuhira y Zambrano, 1989).

### Hidrólisis de los extractos de CaCl<sub>2</sub> y de HCl

Alícuotas de los extractos se trataron con ácido trifluoroacético 2M a 100°C durante 16 horas. El exceso de ácido se eliminó por evaporaciones sucesivas, a presión reducida, añadiendo agua, y el residuo se analizó por CP en los sistemas A y B. Una muestra del producto de hidrólisis se redujo con borohidruro de sodio, se acetiló y se analizó por CGL en los sistemas C y D.

### Cromatografía de intercambio iónico

Muestras de los extractos obtenidos por extracción con CaCl<sub>2</sub> se disolvieron en el mínimo volumen de agua y se sembraron en columnas de DEAE Sephadex A-50, previamente tratada con HCl 1M y lavada con agua destilada hasta pH neutro. La elusión se efectuó con agua destilada hasta que no hubo reacción con el reactivo fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) y luego con ácido fórmico al 10%. Las fracciones eluidas se concentraron y se secaron por liofilización. Alícuotas de las fracciones se sometieron a hidrólisis total y se analizaron por CGL los acetatos de alditoles correspondientes.

### Determinación de la relación ácido manurónico a ácido gulurónico

Muestras de las fracciones obtenidas por extracción directa y por extracción secuencial con carbonato de sodio, se hidrolizaron con ácido sulfúrico según la técnica de Haug y Larsen (1962) y se analizaron por CP en los sistemas B y C. Alícuotas de los hidrolizados de la extracción directa se sometieron a CLAE de acuerdo a la técnica ya descrita (Matsuhira y Zambrano, 1989), se usaron como patrones las lactonas de los ácidos manurónico, galacturónico y glucurónico. La cuantificación de la proporción de los ácidos urónicos se efectuó según la técnica de Gacesa *et al.* (1983).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Ascoseira mirabilis* del orden Fucales y las especies del orden Desmarestiales, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia menziessii* e *Himantothallus grandifolius* se sometieron a extracción secuencial. En la Tabla 1 se presentan los rendimientos de las extracciones para las cuatro especies.

El análisis por cromatografía en papel mostró que los extractos etanólicos contenían manitol, dos compuestos reductores en menor proporción y restos de esteroides. A partir de todos ellos, por CP preparativa se obtuvo de D-manitol de punto de fusión 166° y  $\alpha_D = -0,2^\circ$  (c, 2,0, H<sub>2</sub>O); lit. (Hough y Richardson, 1967) pf. 166°,  $\alpha_D = -0,2^\circ$  (H<sub>2</sub>O). La identidad se corroboró por preparación de su derivado peracetilado que dio pf. 125° y  $\alpha_D = +25,4^\circ$  (c, 0,25, CHCl<sub>3</sub>); lit. pf. 125°  $\alpha_D = +25,4^\circ$  (CHCl<sub>3</sub>); por CGL dio una sola señal cuyo tiempo de retención coincidió con el de una muestra auténtica de hexa-O-acetil-D-manitol.

El residuo de la extracción etanólica de cada alga se extrajo con cloruro de calcio, primero a temperatura ambiente y luego a 70°C. Alícuotas de los extractos se sometieron a hidrólisis total y se analizaron por CP. En la Fig. 1 puede apreciarse que la composición, para una especie dada, de los extractos a las dos temperaturas es muy similar. Además, los productos de hidrólisis de los

Tabla 1  
 RENDIMIENTO DE FRACCIONES OBTENIDAS EN  
 LA EXTRACCIÓN SECUENCIAL DE LÁMINAS

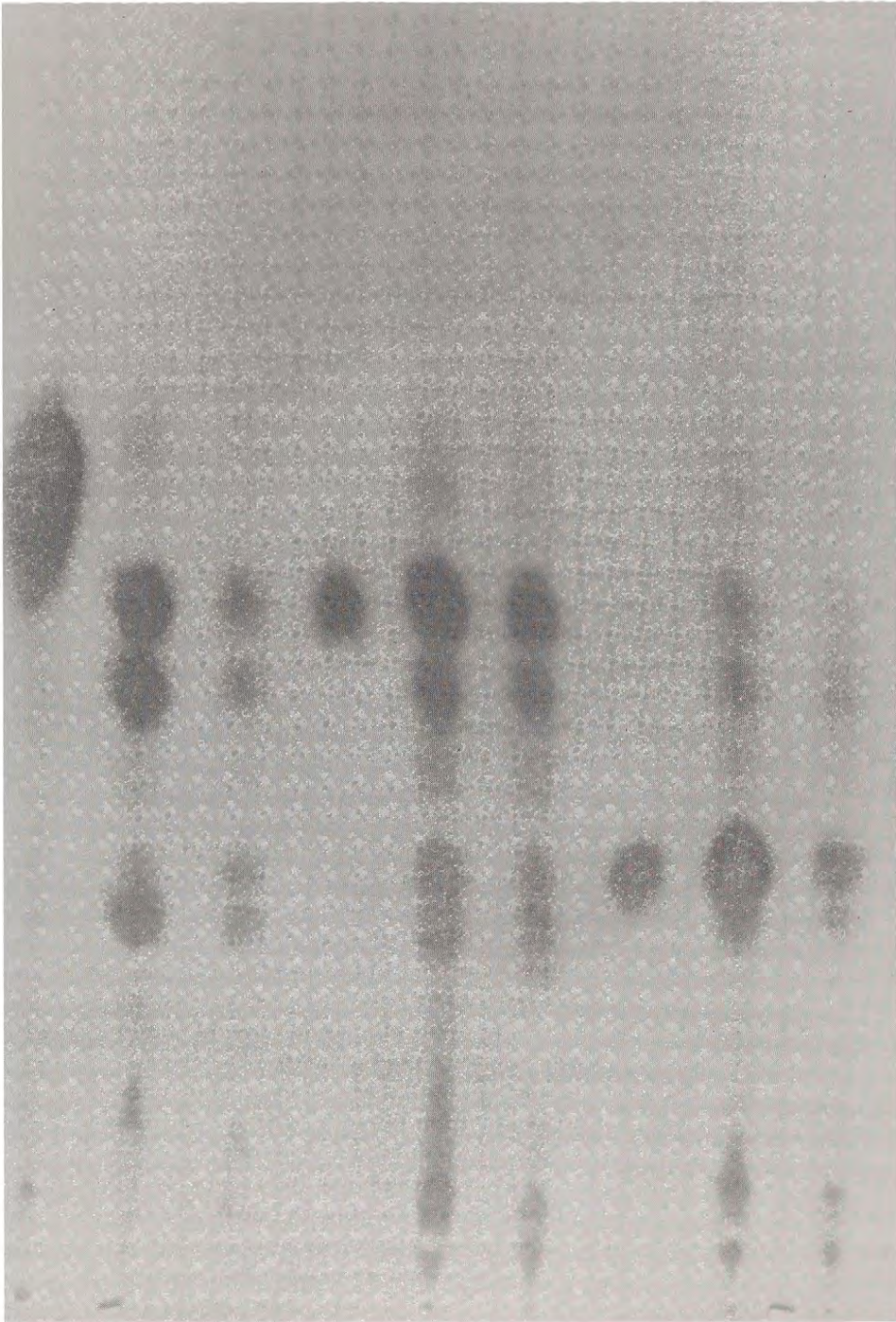
Especie	% Fracciones					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>A. mirabilis</i>	15,9	3,8	2,3	4,0	8,5	21,3 (3,8) <sup>a</sup>
<i>D. anceps</i>	17,7	2,1	2,1	11,7	2,1	23,0 (2,8)
<i>D. menziessii</i>	16,7	2,0	2,2	13,2	4,3	28,7 (3,4)
<i>H. grandifolius</i>	17,1	3,2	2,6	10,0	3,8	23,8 (3,9)

I: etanólica 80%, temp. amb., II: etanólica 80%, a 70°, III: de CaCl<sub>2</sub> 2%, temp. amb., IV: de CaCl<sub>2</sub> 2%, a 70°, V: de HCl (pH=2), VI: de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3%.

<sup>a</sup>: Rendimiento de ácido algínico purificado.

extractos de distintas especies resultaron ser muy parecidos. Todos contienen glucosa, galactosa, xilosa y fucosa, siendo la glucosa el azúcar predominante; además, contienen un ácido urónico cuyo comportamiento en CP, en los sistemas B y D, resultó igual al del ácido glucurónico. Por cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sephadex y elusión con agua destilada se obtuvieron fracciones, con rendimientos del orden del 20%, que por hidrólisis total y CP mostraron estar constituidas solamente de glucosa. La reducción y posterior derivatización del producto de hidrólisis permitió identificar por CGL a la glucosa como único monosacárido constituyente de las fracciones eluidas con agua para todos los extractos estudiados. La elusión con ácido fórmico al 10% permitió aislar la fracción ácida, con rendimientos del orden del 50%, que mostró por hidrólisis y CP estar formada predominantemente por fucosa. Los resultados obtenidos en el análisis de las fracciones extraídas con cloruro de calcio son similares a los obtenidos previamente en este laboratorio para *Lessonia trabeculata* y por Mian y Percival (1973) para *Himantalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata* y *Padina pavonia*, y estarían indicando la presencia de glucanos tipo laminarano en las cuatro especies estudiadas, que se extraen junto a los fucanos. Para *Desmarestia ligulata*, Carlberg *et al.* (1978) han indicado la presencia de cadenas de laminarano que terminan en D-manitol (laminarano M) mientras que el laminarano de *D. firma*, a semejanza de los obtenidos en este trabajo, contiene sólo glucosa.

Para cada alga, el residuo de la extracción con CaCl<sub>2</sub> se agitó con HCl diluido durante 4 horas a 70°C, dando el extracto ácido. Percival y McDowell (1967) han encontrado que en medio ácido es posible extraer polímeros ácidos de fucosa, que poseen residuos de ácidos urónicos y de grupos hemi-éster sulfato. El análisis por CP indicó la presencia de fucosa, galactosa y ácido glucurónico, siendo la composición semejante para las cuatro especies estudiadas y similar al encontrado para el extracto ácido de *Desmarestia ligulata* (Carlberg *et al.*, 1978). El contenido de grupos sulfato varía de un 12,5% para el extracto ácido de *Ascoseira mirabilis*, a un 4,67% para el de *Himantothallus grandifolius*, disminuyendo a 1,65% para *Desmarestia anceps* y 1,44% para *D. menziessii*. El contenido bajo en sulfato que presentan los extractos de las dos últimas no parece ser una característica del género *Desmarestia*. Carlberg *et al.* (*op. cit.*) no publican valores de sulfato para los extractos ácidos de otras especies del género, sino para las fracciones que separaron del fucano de *D. ligulata*. Por cromatografía en DEAE Sephadex, obtuvieron tres fracciones cuyos contenidos de sulfato variaron de 3% a 20%. El "fucano" de *D. firma* dio en las mismas condiciones, dos fracciones que contenían 1% y 8% de sulfato, respectivamente. Los contenidos de sulfato para extractos ácidos de Laminariales del litoral chileno son más altos, siendo de 35,5% para el "fucano" de *Lessonia flavicans* (Villaruel y Zanlungo, 1975), 19,8% para el de *L. trabeculata* (Matsuhiro y Zambrano, 1990) y 7% para el correspondiente a *L. nigrescens* (Percival *et al.*, 1983).



**Fig. 1.** Cromatografía en papel de hidrolizados de los extractos con solución acuosa al 2% de  $\text{CaCl}_2$ .  
1: Ácido D-glucurónico, 2: de *D. menziessii* a temp. amb., 2': de *D. menziessii* a 70°C, 3: L-fucosa, 4: de *H. grandifolius* a temp. amb., 4': de *H. grandifolius* a 70°C, 5: D-glucosa, 6: de *A. mirabilis* a temp. amb., 6': de *A. mirabilis* a 70°C.

Tabla 2  
 RENDIMIENTO DE ÁCIDO ALGÍNICO EN LA  
 EXTRACCIÓN DIRECTA Y RELACIÓN  
 ÁCIDO MANURÓNICO A ÁCIDO GULURÓNICO  
 (M/G) EN LOS HIDROLIZADOS DE  
 ÁCIDO ALGÍNICO

Especie	Ácido algínico %	M/G
<i>A. mirabilis</i>		
lámina	8,8	0,6
disco	4,0	0,4
estipe	6,2	0,3
<i>D. anceps</i>		
lámina	5,8	1,4
disco	11,3	1,7
<i>D. menziessii</i>		
lámina	16,1	2,9
disco	4,5	1,1
<i>H. grandifolius</i>		
lámina	15,5	0,4
disco	4,8	0,1

La extracción en medio alcalino condujo a la obtención de alginato de sodio que luego de sucesivas purificaciones y tratamiento con HCl se transformó, finalmente, en ácido algínico.

Por otra parte, la extracción alcalina directa de láminas, disco y estipes de *A. mirabilis*, y de láminas y discos de las otras tres especies condujo a la obtención de ácido algínico con rendimientos superiores (Tabla 2) para láminas, que en la extracción secuencial. El menor rendimiento de ácido algínico en la extracción secuencial podría atribuirse a la depolimerización parcial por la degradación preferencial del ácido manurónico en las condiciones de trabajo (Carlberg *et al.*, 1978).

En la tabla 2 también aparecen los valores de la relación ácido manurónico a ácido gulurónico (M/G) en los hidrolizados de ácido algínico determinados por CLAE. La relación M/G da una idea de la capacidad del ácido algínico de dar geles rígidos, cuanto menor es esta relación habría mayores unidades de ácido poligulurónico que formarían geles con ion calcio. Los valores típicos de la relación M/G para ácido algínico comercial, extraídos (con rendimientos de 13-30%) de *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum* oscilan entre 1,15 y 1,30 (Sanford y Baird, 1983).

Cheshire y Hallam (1985) encontraron que la composición del ácido algínico varía en los diferentes tejidos del alga *Durvillaea potatorum*, aumentando el contenido de ácido gulurónico gradualmente de lámina a estipe y de estipe a disco. Según estos autores, la variación en composición del ácido algínico en el alga es un mecanismo a nivel celular para dar flexibilidad a láminas y rigidez a los discos. Para tres de las especies analizadas en este estudio se ha encontrado que la relación M/G es menor para las muestras de ácido algínico que provienen de discos que de láminas. Por otra parte, se ha encontrado que el ambiente influye sobre la composición del ácido algínico en una especie dada. Craigie *et al.* (1984) encontraron valores de M/G de 2,17 1,86 y 1,44 para ácido algínico de láminas de *Laminaria longicruris* provenientes de tres localidades expuestas a distintos movimientos de agua de mar, en Nova Scotia, Canadá. Sin embargo, dos especies del género *Desmarestia*, una del Atlántico norte, *D. ligulata* y otra de Sudáfrica, *D.*

*firma*, presentan valores de M/G muy similares, 0,47 y 0,40, respectivamente (Carlberg *et al.*, 1978); estos últimos valores son más bajos que los encontrados en este trabajo para las dos especies del mismo género del litoral antártico.

Recientemente, Kraemer y Chapman (1991) en estudios de adaptación hidrodinámica del alga parda *Egregia menziessii* no encontraron una relación entre las propiedades mecánicas de sus diferentes tejidos y la composición del ácido alginico presente.

### CONCLUSIONES

Las especies antárticas estudiadas contienen diferentes tipos de hidratos de carbono susceptibles de ser aislados bajo condiciones experimentales bastante selectivas.

El hidrato de carbono más importante de peso molecular alto, ácido alginico, puede obtenerse además, directamente, aunque posiblemente contaminado con otros polisacáridos ya que el rendimiento disminuye drásticamente en el proceso de purificación. Los rendimientos en ácido alginico son, en general, menores que aquellos obtenidos de algas pardas de otras regiones geográficas.

Es notoria la proporción de ácido gulurónico en el ácido alginico de *H. grandifolius*, en especial en el disco que estaría sintetizando predominantemente ácido poligulurónico. No es posible concluir de las relaciones M/G encontradas en este trabajo, sobre el papel que el ácido alginico estaría desempeñando en los diferentes tejidos de las algas.

La composición de los extractos de las dos especies del género *Desmarestia* de la Antártica son muy semejantes y diferentes de los valores publicados en literatura para especies del mismo género de zonas más templadas. Esto podría indicar una influencia del ambiente en la biosíntesis de los diferentes hidratos de carbono en las algas pardas.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su reconocimiento al Instituto Antártico Chileno y a la Dirección de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Santiago de Chile por el apoyo brindado. Se agradece al Dr. Renato Westermeier por la muestra de *H. grandifolius* y a los señores Juan Ignacio Palominos, Ingrid Riquelme y Danitza M. Zambrano por la cooperación técnica.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CALBERG, G., E. PERCIVAL y M.A. RHAMAN. 1978. Carbohydrates of the seaweeds *Desmarestia ligulata* and *D. firma*, *Phytochemistry* 17: 1289-1292.
- CRAIGIE, J.S., E.R. MORRIS, D.A. REES y D. THOM. 1984. Alginate block structure in Phaeophyceae from Nova Scotia: Variation with species, environment and tissue-type. *Carbohydr. Polym.* 4: 237-252.
- CHESHIRE, A.C. y N.D. HALLAM. 1985. The environmental role of alginates in *Durvillaea potatorum* (Fucales, Pahaephyta), *Phycologia* 24: 147-153.
- DOGSON, K.S. 1961. Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrates and other sulphate esters. *Biochem. J.* 78: 312-319.
- DUBOIS, M., K. A. GILLES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS y F. SMITH. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- GACESA, P., A. SQUIRE y P.J. WINTERBURN, 1983. The determination of uronic acid composition of alginates by anion-exchange liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 118: 1-8.
- HAUG, A. y B. LARSEN. 1962. Quantitative determination of the uronic acid composition of alginates. *Acta Chem. Scand.* 16: 1908-1918.

- HOUGH, L. y A.C. RICHARDSON. 1967. Penta- hexa- and higher polyhydric alcohols. En: S. Coffey, (Ed.), Rodd's Chemistry of carbon compounds. Elsevier, Nueva York, p. 22.
- KRAEMER, G.P. y D.J. CHAPMAN. 1991. Biomechanics and alginic acid composition during hydrodynamic adaptation by *Egregia menziessii* (Phaeophyta) juveniles. J. Phycol. 27: 47-53.
- MATSUHIRO, B. y D.M. ZAMBRANO. 1989. La relación ácido manurónico a ácido gulurónico en ácido alginico de *Lessonia trabeculata*. Bol. Soc. Chil. Quím. 34: 21-25.
- MATSUHIRO, B. y D.M. ZAMBRANO. 1990. Carbohydrate constituents of *Lessonia trabeculata*. J. Appl. Phycol. 2: 183-185.
- MIAN, A.J. y E. PERCIVAL, 1973. Carbohydrates of the brown seaweeds *Himanthalia lorea*, *Bifurcaria bifurcata* and *Padina pavonia*. Carbohydr. Res. 26: 133-146.
- PERCIVAL, E., y R.H. MCDOWELL, 1967. Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides, Academic Press, London, págs. 53-69; 157-164.
- PERCIVAL, E., M.F. VENEGAS JARA y H. WEIGEL. 1983. Structural studies on the water-soluble fucan from *Lessonia nigrescens* Carbohydr. Res. 125: 283-290.
- RAMÍREZ, M.E. 1982. Catálogo de las algas marinas del territorio chileno antártico, INACH Serie Científica, 29: 39-67.
- SANFORD, P.A. y J. BAIRD. 1983. En: The polysaccharides, Vol. 2, G.O. Aspinall ed., Academic Press, Orlando, pp. 448-450.
- VILLARROEL, L.H. y A. B. ZANLUNGO. 1975. Polisacáridos de algas chilenas I. El fucoidano de la *Lessonia flavicans*. Rev. Latinoamer. Quím. 6: 127-130.
- WHISTLER, R.L. y M.L. WOLFROM. 1968. Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. I., Academic Press, Nueva York, 1968, pp. 28-29.

Recibido: 31.01.92. Aprobado: 23.03.92